



Vasomotricité Endothélium-Dépendante et Activité physique : approches expérimentales chez le rat diabétique et cliniques chez des sujets sains, sédentaires, en surpoids ou obèses

Mohamed Sami Zguira

► To cite this version:

Mohamed Sami Zguira. Vasomotricité Endothélium-Dépendante et Activité physique : approches expérimentales chez le rat diabétique et cliniques chez des sujets sains, sédentaires, en surpoids ou obèses. Médecine humaine et pathologie. Université Rennes 2; Université de Sousse (Tunisie), 2014. Français. NNT : 2014REN20059 . tel-01170278

HAL Id: tel-01170278

<https://theses.hal.science/tel-01170278>

Submitted on 1 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE / UNIVERSITE RENNES 2

Sous le sceau de l'Université européenne de Bretagne

Présentée par

Mr. Mohamed Sami Zguira

**pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 2**

Mention : STAPS

Ecole doctorale Vie, Agro, Santé (VAS)

**Préparée au laboratoire Mouvement, Sport, Santé M2S
(EA 1274)**

Université Rennes 2

Thèse soutenue le 29/03/2014 devant le jury composé de :
M. Mosadok Ben Attia Président du jury

Professeur, faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie

M. Pascal LAURANT Rapporteur

Professeur, Université d'Avignon, France

M. Nabil ATTIA Rapporteur

Maître de conférences, faculté des Sciences de Bizerte,
Tunisie

Mme Saloua BEN KHAMSA Examinateur

Professeur, faculté de médecine de Tunis, Tunisie

M. Bernard SAIAG Directeur de thèse

Professeur Emérite, Université de Rennes 2, France

M. Zouhair TABKA Directeur de thèse

**Vasomotricité Endothélium-Dépendante
et Activité physique :**

**Approches expérimentales chez le rat
diabétique et cliniques chez des sujets
sains, sédentaires, en surpoids ou obèses**

REMERCIEMENTS

J'aimerais en tout premier lieu adresser ma plus sincère gratitude à mes directeurs de thèse, Monsieur le Professeur Bernard SAIAG et Monsieur le Professeur Zouhair TABKA.

Monsieur le Pr SAIAG, un homme de sciences, passionné par tout ce qu'il fait, par les vaisseaux et dévoué pour l'endothélium. Je vous suis très reconnaissant pour votre disponibilité et vos précieux conseils. Merci pour votre soutien qui m'a permis de voir clair notamment dans certains moments difficiles.

Monsieur le Pr TABKA, vous étiez toujours présent pour guider mes pas. Vos conseils et vos enseignements m'ont beaucoup aidé à évoluer. Merci pour tout.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Mosadak Ben Attia d'avoir accepté d'être président du jury de cette thèse.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Pascal LAURANT et à Monsieur le Docteur Nebil Attia qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ce travail et à Mme le Professeur Saloua Ben Khamse-Jamleddine d'accepter d'être examinatrice de ce travail.

Un grand merci à tous mes collègues du laboratoire de physiologie et des explorations fonctionnelles de la faculté de médecine de Sousse et mes collègues du laboratoire « M2S », du laboratoire de physiologie médicale de la faculté de médecine de Rennes 1 pour votre accueil et votre collaboration.

Je remercie le Dr Sophie VINCENT pour son aide et sa disponibilité.

Toute ma gratitude à tous ceux qui ont cru, croient et croiront toujours en moi : mes parents Abdelaziz et Wassila, qui m'ont permis de poursuivre mes études et atteindre mes objectifs, mes frères Hichem, Hamdi et Oussema ; mes sœurs : Nousa, Haifa, Amira, Sana, Maryem et Touta ; à mes beaux frères Habib, Imed, Mounir et Zied; qui étaient toujours présents pour me soutenir et à toute ma famille Zguira et Ouhaichi.

Mes vifs remerciements à mes très chers amis Youssef, Catherine, Yasser, Momo et tous mes ami(e)s en France et en Tunisie.

Je remercie également mon beau père Khaled et ma belle mère Saloua ; Mahmoud et Dorra, Farah, Youssef, François et Brigitte

Un grand merci à ma compagne, Rania pour sa patience durant les moments difficiles.

Je dédie ce travail à mon très cher fils Aziz.

Sommaire

Introduction	11
I- REVUE DE LA LITTERATURE	19
1- La paroi vasculaire.....	19
1.1. Historique	19
1.2. Structure générale du système vasculaire	20
1.3. Structure de la paroi vasculaire	20
1.3.1. L'adventice,	21
1.3.2. La média,.....	21
1.3.3. L'intima.....	21
2. Généralité sur le contrôle endothélial du diamètre vasculaire	23
2.1. Contrôle intrinsèque	23
2.1.1. Autorégulation du débit	24
2.1.2. L'hyperémie.....	25
2.1.2.1. L'hyperémie active (fonctionnelle)	25
2.1.2.1. L'hyperémie réactionnelle post-occlusive (HRPO)	26
2.1.3. Réactions à une lésion vasculaire	27
2.2. Contrôle extrinsèque.....	28
2.2.1. Contrôle extrinsèque « strict ».....	28
2.2.2. Innervation péri-vasculaire, innervation sympathique et contrôle du tonus vasculaire	28
3. Physiologie de la vasomotricité endothélium-dépendante	30
3.1. Les différentes fonctions de l'endothélium	31
3.2. Facteurs endothéliaux vasodilatateurs	34
3.2.2. L'Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)	34
3.2.3. L'Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF) ou NO.....	35
3.2.3.1. Biosynthèse du NO	36
3.2.3.2. Isoformes de la NOS.....	38
i. La NOSi.....	38
ii- La NOSn	38

iii- La NOSe.....	39
3.2.3.3. Modalités de biosynthèse du NO d'origine endothéliale	40
3.2.3.4. Diffusion et mécanismes d'action du NO.....	41
3.2.4. L'ADP, l'ATP, l'AMP, l'adénosine et les récepteurs purinergiques	43
3.3. Facteurs endothéliaux vasoconstricteurs	45
3.4. Synthèse sur la modulation endothéliale de la vasomotricité.....	48
4- Les dysfonctionnements endothéliaux dans différentes pathologies	49
4.1. Mécanismes de la dysfonction endothéliale	53
4.2. Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle (HTA)	54
4.3. Dysfonction endothéliale et insuffisance cardiaque	55
4.4. Dysfonction endothéliale et hypercholestérolémie.....	57
4.5. Dysfonction endothéliale et diabète	58
4.5.1. Généralités sur le diabète.....	58
4.5.2. Endothélium et diabète	61
4.6. Dysfonction endothéliale, surpoids et obésité	62
4.7. Dysfonction endothéliale et vieillissement.....	63
4.8. Dysfonction endothéliale et l'inflammation	65
5- Vasomotricité endothélium dépendante et activité physique.....	66
5.1. Mécanismes des effets de l'activité physique sur l'endothélium et la vasomotricité....	66
5.2. Effets de l'activité physique sur les dysfonctionnements endothéliaux associés à différentes pathologies et facteurs de risques cardiovasculaires.....	68
5.2.1. Activités physiques et pathologies cardiovasculaires.....	69
5.2.2. Activités physiques et diabète	72
5.2.3. Activités physiques, surpoids et obésité	74
5.2.4. Modalités de l'activité physique et effets sur la vasodilatation endothélium dépendante	75
PREMIERE PARTIE	83
DEUXIEME PARTIE	96
TROISIEME PARTIE.....	127
DISCUSSION GENERALE & CONCLUSION.....	168
Fiches techniques	179

Liste des publications

- Article publié

- **Zguira MS**, Vincent S, Le Douairon Lahaye S, Malarde L, Tabka Z, Saiag B. Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Feb 11;12:32 (**IF 4.21**)

- Articles soumis ou en préparation

- **Mohamed Sami Zguira**, Hanène Miâadi-Messaoud, Helmi Ben saad, Haythem Debbabi, Bernard Saiag, Zouhair Tabka. Effects of an acute exercise on endothelium function in athletics young subjects: a case control study. *Microvascular Research*, January 15 (Under review). (**IF 3.07**)
- **Mohamed Sami Zguira**, Hanène Miâadi-Messaoud, Afef Chouchane, Bernard Saiag, Zouhair Tabka. Does exercise improve endothelial function in obese female? En préparation.

LISTE DES ABREVIATIONS

ACh : Acétylcholine

ADP : Adénosine Diphosphate

ADP β S : ADP stable adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate)

AVC : Accidents Vasculaires Cérébraux

Ag II : Angiotensine II

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AP : Activité Physique

ATP : Adénosine Triphosphate

BH4 : Tétrahydrobioptérine

BK : Bradykinine

Ca²⁺ : Calcium

CRP : Protein C-Réactive (C-reactive protein)

EDCF : Endothelium Derived Contracting Factor

EDHF : Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor

EDRF : Endothelium Derived Relaxing Factor

ERO : Espèces Radicalaires Oxygénées

ET-1, 2, 3 : Endothéline-1, 2, 3

ETA, ETB : Récepteurs à l'endothéline

GMPc : Guanidine Monophosphate cyclique

GPx : Gluthation peroxydase

HDL : Lipoprotéine de haute densité (high density lipoprotein)

IL6 : Interleukine-6

IR : Récepteurs de l'insuline

LDL : Lipoprotéine de basse densité (low density lipoprotein)

L-NAME ou L-NMMA : N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester

NADPH: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NO : Monoxyde d'azote

NOS: NO synthase

Nox: NADPH oxydase

ONOO⁻ : Anion peroxynitrite

O₂⁻: Anion superoxyde

PGF : Prostaglandines F

PGI₂ : Prostacycline

PKC : Protéine kinase C

GCs : Guanylate cyclase soluble

Shear Stress : Forces de cisaillement

SNP : Nitroprussiate de sodium

SOD: Superoxyde Dismutase

TxA2 : Thromboxane A2

UTP: Uridine Triphosphate

VEGF: Vascular Endothelium Growth Factor

$\dot{V}O_{2\max}$: Débit maximal d'oxygène

TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances

TNF- α : facteur nécrosant de tumeur (Tumor necrosis factor- α)

- **Liste des figures**

Figure 1. Structure de la paroi vasculaire

Figure 2. Activation de la NOSe par les forces de cisaillement

Figure 3. Autorégulation du débit sanguin local par action sur les cellules musculaires lisses : hyperémie active et hyperémie post-occlusive

Figure 4. Schématisation des effets de différents facteurs environnant sur la réponse endothéliale

Figure 5. Régulation de la vasodilatation par l'endothélium vasculaire

Figure 6. Structure chimique du NO

Figure 7. Voie de synthèse du monoxyde d'azote par la NOS d'origine endothéliale

Figure, 8. Voie d'activation de la NOSe dépendante ou indépendante du calcium

Figure 9. Mécanisme d'action du NO

Figure 10 : Régulation de la vasoconstriction par l'endothélium vasculaire

Figure 11. Différentes fonctions de l'endothélium vasculaire

Figure 12. Rôle de la dysfonction endothéliale dans la pathogenèse des maladies cardiovasculaires

Figure 13. Effets de l'exercice dans certaines pathologies sur la paroi vasculaire

Figure 14. Comparaison entre sportifs et sédentaires

- **Liste des tableaux**

Tableau 1 : patients insuffisants cardiaques chroniques

Tableau 2 : patients athéromateux chroniques

Tableau 3 : patients diabétiques

INTRODUCTION

Introduction

On assiste de nos jours à une augmentation de la prévalence des maladies cardiovasculaires qui représentent, selon l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), la première cause de mortalité dans le monde. La mortalité par maladies cardiovasculaires est la plus élevée par rapport aux autres causes (OMS, 2010). L'estimation du nombre de décès imputables aux maladies cardiovasculaires s'élève à 17.3 millions soit 30% de la mortalité mondiale totale. On estime que 7.3 millions sont dus à une cardiopathie coronarienne et 6.2 millions à un Accident Vasculaire Cérébral (AVC) (Woo et coll, 2013). L'augmentation de la prévalence de ces maladies n'est pas limitée aux pays industrialisés mais également elle touche les pays en voie de développement. Il est rapporté que, plus de 80% des décès interviennent dans des pays à revenu moyen ou faible et touchent presque également hommes et femmes (OMS, 2011). Des prévisions de l'OMS affirment que, d'ici 2030, près de 23.3 millions de personnes mourront d'une maladie cardiovasculaire (cardiopathie ou AVC principalement). Les maladies cardiovasculaires sont favorisées et surviennent suite à des facteurs de risque liés à une mauvaise hygiène de vie, une mauvaise alimentation, l'obésité, le tabagisme, la sédentarité, l'hypertension artérielle, le diabète et l'hyperlipidémie (Lim et coll, 2013).

Depuis 1980, il a été démontré que la couche la plus interne (en contact avec le sang) des vaisseaux, appelée l'endothélium, joue un rôle primordial dans la régulation de la vasomotricité. Cette régulation s'effectue par la production de facteurs vasoconstricteurs et/ou vasodilatateurs biologiquement actifs dans le but d'augmenter ou de diminuer la résistance vasculaire. De plus, l'endothélium régule la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et l'agrégation ainsi que l'adhésion plaquettaire (Golbidi et Laher, 2013).

Par ailleurs, entre autres, l'endothélium module la coagulation, les processus inflammatoires et l'angiogenèse (Verma et Anderson, 2002). Le dysfonctionnement endothélial est souvent la cause d'apparition de maladies cardiovasculaires graves (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, etc...). La dysfonction endothéliale, en termes de vasomotricité, est définie comme une altération fonctionnelle caractérisée par une réduction de la production de substances vasodilatatrices et une augmentation de celle de substances vasoconstrictrices dérivées d'origine endothéliale.

Il est à noter que la plupart des patients ayant des troubles du métabolisme glucidique, plus connu sous le terme de « diabète », développent des complications cardiovasculaires sévères (Rubler et coll, 1972 ; Vanhoutte et coll, 2013). Cette pathologie, considérée par l'OMS comme une pandémie, est un véritable problème de santé publique. Selon l'OMS, en 2000 le nombre de personnes atteintes de cette pathologie à travers le monde est estimé à 171 millions, à 265 millions en 2010, à plus de 347 millions de nos jours et pourrait atteindre 440 millions d'ici 2030 (Wild et coll, 2004). L'incidence du diabète augmente considérablement dans les pays en voies de développement à cause d'une mauvaise alimentation, de l'obésité et de la sédentarité. Selon l'OMS, plus de 80% des décès par diabète se produisent dans les pays en développement (Mathers CD et coll, 2006). La santé et l'exercice physique ont été, dans certaines cultures considérés comme strictement complémentaires et comme des piliers essentiels du mode de vie. Maintenant, une prise de conscience se fait et celle-ci s'appuie tant sur des données scientifiques que sur des évidences pragmatiques. Ainsi « bouger » permet de prévenir ou de limiter l'apparition de certaines pathologies cardiovasculaires associées par exemple au diabète, à la sédentarité, au surpoids et à l'obésité. En conséquence, tout moyen

thérapeutique ou préventif amenant à une amélioration transitoire ou continue de la perfusion myocardique, cérébrale ou musculaire ne peut être que bénéfique sur le plan fonctionnel. C'est pourquoi, une activité physique et sportive (surtout de loisir) régulière et une modification adaptée des habitudes alimentaires sont actuellement reconnues comme des moyens préventifs. Il est en effet démontré par des sources scientifiques et épidémiologiques que des maladies cardiovasculaires se développent consécutivement à une période de sédentarité très longue (Leung FP et coll, 2008).

Il est bien connu que l'entraînement physique est associé à une augmentation de la capacité des vaisseaux sanguins à transporter le sang. Cette capacité est le résultat de nombreuses adaptations au niveau du système cardiovasculaire, notamment au niveau de l'endothélium avec une augmentation de la vasodilatation endothélium-dépendante chez des sujets entraînés. En effet, l'endothélium, connu pour ses fonctions de régulation et de maintien de l'équilibre vasomoteurs et de l'homéostasie, répond à chaque stimulus physique ou chimique par la libération de substances vasodilatatrices comme le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), l'endothelium derived hyperpolarising factors (EDHF), l'adénosine triphosphate (ATP) et l'adénosine diphosphate (ADP) et de substances vasoconstrictrices (endothéline ET1, thromboxane A₂ et prostaglandine H₂) (Pitré et coll, 1998). D'autre part, le système nerveux autonome (système sympathique et parasympathique) est impliqué dans la régulation de la vasomotricité par l'intermédiaire, entre autres, des récepteurs adrénergiques, cholinergiques et purinergiques (Saiag et coll, 1996). En effet, au niveau des terminaisons nerveuses périvasculaires, la noradrénaline et l'acétylcholine (ACh) sont libérées conjointement avec l'ATP pour agir sur leurs récepteurs spécifiques musculaires lisses ou

endothéliaux. L'ATP est certes une molécule importante d'un point de vue énergétique et dans la régulation cellulaire (Communi D et coll, 1996) mais c'est aussi un neuromédiateur (présent dans la vésicule pré-synaptique noradrénergique et cholinergique). L'ATP est, entre autres, libéré par les plaquettes, les muscles, les cellules endothéliales, les cellules nerveuses (Burnstock G et coll. 1990) (Milner P et coll. 1990). L'ATP une fois libéré, agit soit directement soit sous forme d'ADP ou d'AMP ou d'adénosine sur des catégories cellulaires adjacentes (muscle lisse vasculaire et endothélium). L'ensemble de ces molécules est impliqué dans des mécanismes de régulation de la vasomotricité, la prolifération cellulaire et l'induction de sécrétions par des glandes endocrines et exocrines. Woo et coll. (2004), ont montré que la fonction endothéliale est améliorée grâce à un régime et l'activité physique chez les enfants obèses. Watts et coll. (2004), ont prouvé qu'un programme d'entraînement adapté améliore le fonctionnement vasculaire chez les adolescents obèses. Cohen et coll. (2008), ont montré qu'un programme d'entraînement adapté améliore la fonction endothéliale chez les adultes diabétiques. Kim et coll. (2006) ont montré que plus le nombre de facteurs de risques cardio-vasculaires augmente plus la fonction endothéliale est dégradée. Melikian et coll. (2008), ont montré que chez les sujets atteints d'un syndrome métabolique, la fonction endothéliale est plus dégradée.

De plus, il a été montré que d'autres molécules appartenant au système antioxydant (le Stress Oxydant, SO) interviennent dans la régulation de la vasomotricité lors de complications diabétiques en piégeant le NO (par l'anion superoxide). De même, l'activité physique aiguë est productrice de SO et peut amener à une perturbation de la vasomotricité NO-dépendante.

Les connaissances relatives aux effets de l'exercice sur la paroi vasculaire et particulièrement l'endothélium, de sujets sains, sont maintenant de plus en plus connues pour ce qui concerne la relaxation endothélium dépendante à l'ACh et dans une moindre mesure aux purines. Saïag et al 1996, ont montré dans une étude comparative qu'un ADP stable (l'adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) ou ADP β S) induit une vasodilatation via des récepteurs purinergiques P2Y endothéliaux entraînant la libération par l'endothélium de PGI₂ et de NO. Par contre, peu d'informations sont acquises quant à l'impact de l'exercice sur la relaxation endothélium dépendante lorsqu'un trouble du métabolisme glucidique est installé. Par ailleurs, la plupart des études chez des diabétiques ont été réalisées avec des activités physiques modérées (Heyman E et coll, 2007). Il est classiquement admis que cette activité physique modérée permet d'améliorer la vasodilatation endothélium dépendante. En revanche, lorsque l'activité physique est intense aussi bien chez les sujets sains que chez les sujets pathologiques, les effets sur la fonction endothéliale sont très controversés (Walsh et coll 2003). Dans cette optique, nous allons élaborer un protocole dans lequel seront étudiés les effets d'un entraînement intense chez des rats diabétiques de type 1.

De ce fait, dans une première étude, l'objectif est d'évaluer les effets de l'entraînement sur les mécanismes responsables de la vasodilatation endothélium dépendante, via le NO, induite par l'ACh et un ADP stable l'ADP β S chez des animaux sains et diabétiques. Nous explorerons ainsi les possibles différences entre les animaux sains et diabétiques (type 1) à l'exercice ou non, en termes d'effets vasodilatateurs de l'ACh et de l'ADP β S via leurs récepteurs spécifiques. Nous aborderons également le niveau d'implication de la voie du NO couplée à ces récepteurs chez les animaux expérimentaux.

De même, chez l'homme, il existe des ambiguïtés et des résultats controversés quant aux effets de l'exercice aigu sur la vasodilatation endothéliale dépendante. Ainsi, beaucoup d'études résultant de protocoles d'exercices variés (Goto et coll, 2003) présentent des résultats contradictoires.

C'est pourquoi, dans un deuxième temps, nous allons explorer l'effet de l'entraînement chez des sujets jeunes (comparés à des sujets sédentaires) sur la fonction endothéliale avant et après un exercice aigu.

D'autres études ont proposé la pratique d'une activité physique dans les programmes de lutte et de prévention contre les dysfonctionnements endothéliaux (Epstein, 1996 ; Brandou et coll, 2003 ; Lazzer S et al, 2004). A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées à la fois à l'effet d'un réentraînement individualisé par l'exercice musculaire sur la fonction endothéliale mesurée par la technique du laser doppler couplée à l'iontophorèse de l'acétylcholine, à l'aptitude aérobie et aux biomarqueurs de l'inflammation chez des femmes Tunisiennes obèses.

Ainsi, dans un troisième temps nous allons déterminer les effets d'un entraînement physique, individualisé, de deux mois chez des femmes obèses comparativement à des sujets normaux, sur la fonction endothéliale et sur les biomarqueurs de l'inflammation. Cette étude est également menée par débimétrie « Laser Doppler ».

Nous allons donc, dans la présente thèse, commencer par une revue exhaustive des données de la littérature concernant tout d'abord les caractéristiques structurales, métaboliques et fonctionnelles de la paroi vasculaire, puis des généralités sur le diabète et de nombreuses

pathologies cardiovasculaires ainsi que les altérations qu'elles induisent notamment en terme de dysfonctionnements endothéliaux. Enfin, nous ferons le point sur les apports de l'activité physique dans la restauration de fonctions endothéliales préalablement altérées.

La première étude est une approche expérimentale qui aura pour objectif de déterminer les effets d'un entraînement intense sur les mécanismes responsables de la vasodilatation endothélium dépendante via le NO chez des rats rendus diabétiques (type 1). Cette étude est réalisée sur l'aorte thoracique isolée de rats précontractée par la phenylephrine.

La deuxième étude est une approche clinique, chez des adolescents sains âgés de 14 à 16 ans. L'enjeu majeur de cette étude est de vérifier si l'entraînement préalable modifie la vasomotricité endothélium dépendante après un exercice aigu. Cette étude est réalisée au niveau de l'avant-bras par la débimétrie « Laser Doppler » comparativement entre sujets entraînés et sujets sédentaires.

La troisième étude aura pour but d'analyser les effets d'un exercice musculaire individualisé de deux mois chez des femmes obèses comparativement à des sujets normaux, sur la fonction endothéliale et sur les biomarqueurs de l'inflammation. Cette étude est également menée par débimétrie « Laser Doppler ».

REVUE DE LA LITTERATURE

I- REVUE DE LA LITTÉRATURE

1- La paroi vasculaire

1.1. Historique

Le système circulatoire est le premier système d'organes à se développer dans l'embryon des vertébrés et sa présence est indispensable, d'une part, pour le transport de l'oxygène et des nutriments vers les tissus en croissance et d'autre part pour l'élimination des déchets métaboliques. Dans ce système circulatoire, la paroi vasculaire est constituée de trois couches. La couche luminale (en contact avec le sang) est constituée de cellules endothéliales. Ces dernières sont impliquées dans de nombreux processus tels que l'angiogenèse, la régulation de l'hémostase, la perméabilité et la vasomotricité (Marcelo et coll, 2013). Pour ce qui concerne la régulation de la vasomotricité par les cellules endothéliales ou vasomotricité endothélium dépendante, celle-ci a été mise en évidence par les travaux de Furchgott et Zawadzki (1980). Ce fut la première étude démontrant que l'endothélium n'est pas une simple barrière passive entre la paroi vasculaire, le sang et les tissus environnants. Ainsi, ces auteurs ont démontré, sur des préparations d'artères isolées de lapin précontractées par la noradrénaline (NA), que selon la présence ou non d'un endothélium fonctionnel, l'ACH provoque ou non une vasodilatation doses dépendante (Furchgott et Zawadzki, 1980). L'endothélium est non seulement un tissu à fonctions multiples mais aussi l'un des plus répandus dans l'organisme (2.5 Kg pour un adulte de 70 Kg). Il est ainsi considéré comme un organe paracrine, endocrine et ubiquitaire. Pour la partie endocrine, citons par exemple sa capacité à sécréter des substances vasorelaxantes qui dans un premier temps ont été appelées « Endothelium-Derived Relaxing Factor » ou EDRF. Plus tard, il a été démontré que cet

EDRF est le monoxyde d'azote (NO) (Ignarro et coll, 1987 ; Furchgott, 1996, Sobey et coll 2001). Par ailleurs, il a été prouvé que conjointement à cette sécrétion de NO d'autres molécules étaient libérées avec des variantes selon les lits vasculaires concernés : la prostacycline (PGI₂) (Vane J, 1980) et l'EDHF (Vanhoutte et coll, 2013).

1.2. Structure générale du système vasculaire

La distribution du sang dans l'organisme s'effectue via des vaisseaux dont la structure, la taille et la fonction sont variables. Il existe ainsi plusieurs types de vaisseaux à savoir les artères, les veines et les capillaires. L'ensemble de ces vaisseaux constitue un réseau vasculaire de transport sanguin (comportant des artérioles, des veinules et des capillaires) permettant d'une part l'apport de l'oxygène (O₂) et des nutriments à toutes nos cellules et d'autre part l'élimination du dioxyde de carbone (CO₂) et de métabolites. Le sang, à sa sortie du cœur gauche, parcourt l'arbre artériel qui se ramifie de grosses, moyennes à petites artères et finit à l'extrémité sous forme d'artérioles qui aboutissent dans les capillaires des tissus. A sa sortie des capillaires, le sang va circuler dans l'arbre veineux en utilisant des vaisseaux de diamètres de plus en plus élevés en passant par les veinules, les veines et enfin les grosses veines qui convergent vers le cœur droit.

1.3. Structure de la paroi vasculaire

De nombreux vaisseaux sanguins de l'organisme sont constitués de trois couches ou tuniques concentriques et leurs proportions varient selon les catégories vasculaires. Ces couches sont appelées respectivement : l'adventice (couche externe), la média (couche moyenne) et l'intima ou endothélium (couche interne) (Figure.1).

1.3.1. L'adventice,

Est peu ou très présente selon le type de vaisseau. Elle est constituée de fibres lâches de collagène, de quelques fibres élastiques épaisses et de fibroblastes. L'organisation de l'adventice est la même quel que soit le type de vaisseau. Elle permet l'emballage des vaisseaux et leurs positionnements dans leur environnement immédiat (Camillerie et coll, 1987 ; Fawcett et Jenseh, 2002 ;). A l'intérieur de cet adventice, se trouvent des terminaisons nerveuses dont la nature varie en fonction de la localisation des vaisseaux. (Gillian et Richard, 2004).

1.3.2. La média,

Contient des constituants extracellulaires (fibres élastiques, fibrilles d'élastine, fibres et fibrilles de collagène et des protéoglycanes) et exclusivement des cellules musculaires lisses (CML) orientées en hélices dont la principale fonction est le maintien du tonus et la résistance vasculaire (Camillerie et coll, 1987, Gillian et Richard, 2004).

1.3.3. L'intima,

Appelée aussi l'endothélium : est une monocouche de cellules pavimenteuses tapissant la face interne de tous les vaisseaux. Les cellules de l'endothélium (dites cellules endothéliales) possèdent des grands axes qui sont orientés longitudinalement et soutenus par une couche sous-jacente mince de tissu conjonctif lâche (Camilleri et coll, 1987 ; Fawcett et Jenseh, 2002).

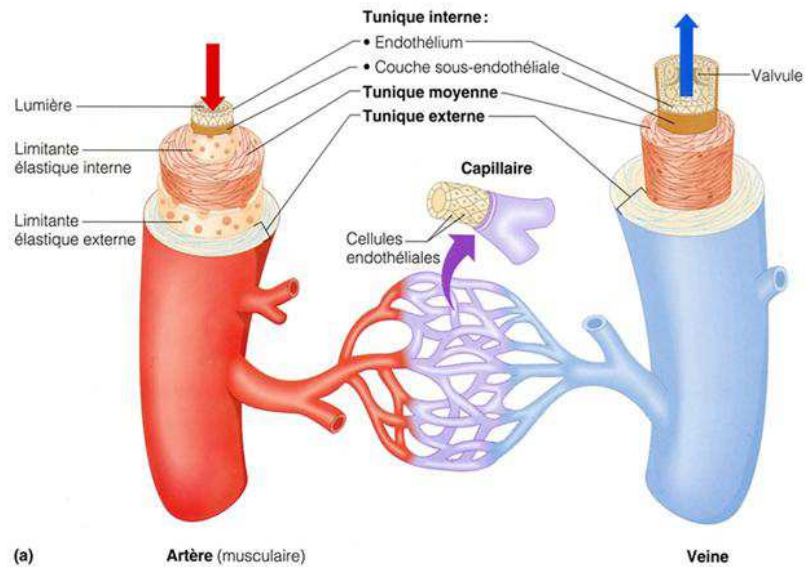


Figure 1. Structure de la paroi vasculaire (Marieb, 2005)

La paroi artérielle est structurellement et fonctionnellement compartimentée. Chaque compartiment est caractérisé par un type de cellules spécifiques, et par des interactions spécifiques. La face luminale de l'endothélium interagit avec le sang circulant, et l'autre face adjacente à l'adventice interagit avec le tissu environnant. La média contient des cellules musculaires lisses effectrices qui reçoivent les messages centrifuges de l'endothélium et centripètes à partir des tissus métaboliquement actifs, des terminaisons nerveuses de l'adventice et de peptides produites dans le tissu interstitiel. Le degré de contraction ou de relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires caractérise la tonalité générale vasomotrice qui régit le niveau local de la pression artérielle et distribue le débit en fonction des besoins métaboliques (Michel et coll, 1998). Dans ces processus de régulation, le NO/EDR Le NO est le médiateur majeur. Cet élément régulateur et vasoactif est produit par NO est un messenger intercellulaire synthétisé par les cellules endothéliales (Collin et Levy,

2008) et produit par la NO synthase de type 3, une enzyme qui est constitutivement exprimée par les cellules endothéliales. L'activité du NO sur son substrat, l'arginine, est régie par la concentration de calcium libre et par la phosphorylation intracellulaire. En 1980, Furchgott et Zawadski expliquent que sous l'effet du carbachol (analogue de l'ACh) l'endothélium sain résulte de l'EDRF, qui plus tard, a été identifié comme étant le NO. Ce gaz diffuse vers les cellules du muscle lisse vasculaire voisines pour activer la guanylate cyclase soluble du muscle lisse et produire du GMP cyclique (un second messenger). L'augmentation de la concentration intracellulaire de GMP cyclique au niveau de la cellule musculaire induit alors la relaxation.

2. Généralités sur le contrôle endothélial du diamètre vasculaire

Le tonus contractile basal du muscle lisse vasculaire (MLV) dépend de facteurs physiques et chimiques. Il est également appelé tonus myogène. Ce tonus correspond à une activité spontanée totalement indépendante des influences nerveuses, hormonales ou paracrines. Cette activité contractile peut être modulée par des stimuli variés qui vont agir sur la concentration intracellulaire de calcium des cellules musculaires lisses vasculaires. Ces mécanismes cellulaires et moléculaires qui vont moduler l'état contractile du MLV (donc moduler le diamètre des vaisseaux) vont en conséquence agir sur la résistance vasculaire. Ces mécanismes sont soit de type intrinsèque, soit de type extrinsèque.

2.1. Contrôle intrinsèque

Cette catégorie de contrôle correspond à des mécanismes propres au tissu de l'organe irrigué, qui sont indépendants des contrôles nerveux et hormonaux. Le débit sanguin local est contrôlé par une modification de la résistance des artérioles induite par des changements ; soit de la

pression artérielle au niveau de l'organe (autorégulation du débit), soit de l'activité métabolique (hyperémie active), soit d'une interruption temporaire totale de l'apport sanguin (hyperémie réactionnelle), ou soit d'une lésion tissulaire (inflammation).

2.1.1. Autorégulation du débit

Cette régulation est de type myogénique et permet de maintenir la pression en aval constante afin de protéger le tissu perfusé d'éventuelles variations de pression. Trois mécanismes paraissent impliqués simultanément :

- Le premier mécanisme (commun à celui de l'hyperémie active) correspond à la réduction de la pression sanguine dans un organe donné et qui va induire, dans le milieu extracellulaire, une réduction de la concentration en O_2 , une augmentation des concentrations en CO_2 , en ions H^+ et en certains métabolites vasodilatateurs.
- Un étirement (stretch) du muscle lisse artériolaire. Ce « stretch » est provoqué par une augmentation de la pression artérielle. Cette augmentation induit une contraction du MLV (l'inverse induisant une relaxation du MLV). Ce type d'autorégulation est lié à des modifications des mouvements du calcium à travers la membrane cellulaire ;
- Le troisième mécanisme correspondant aux forces de cisaillement (shear stress) dues à la pression sanguine. Ces forces de cisaillement vont, en conséquence, induire une vasodilatation flux-dépendante tant au niveau artériolaire qu'au niveau des artères et des veines. Cette vasodilatation est médiée par l'endothélium. En effet, des canaux sensibles au shear stress sont présents au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales et leurs stimulations vont provoquer la libération non seulement

du NO mais aussi d'ATP et d'UTP, tout en régulant la libération d'endothéline (ET1) par l'endothélium. On parle alors de vasodilatation endothélium-dépendante.

D'autres formes d'activation, dites activation calcium-indépendante (nécessitant la phosphorylation de la NOSe), peuvent se faire par ces forces de cisaillement. Ces forces orientées d'une façon longitudinale sont variables en fonction du débit sanguin local et des conditions d'écoulement. Ces forces stimulent les récepteurs membranaires de la cellule sensibles à l'étirement. Des cascades complexes de réactions biochimiques entraînent une activation de la transcription du gène codant par la NOSe. Plus les forces de cisaillement sont importantes plus on note une synthèse élevée induction de l'ARNm de la NOSe (Carson et coll, 1996) (Figure.2).

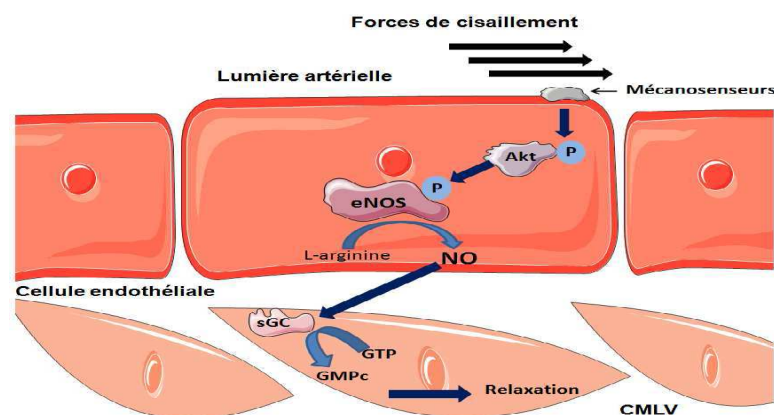


Figure 2. Activation de la NOSe par les forces de cisaillement (Pellegrin M et coll, 2008)

2.1.2. L'hyperémie

2.1.2.1. L'hyperémie active (fonctionnelle)

Elle correspond à une élévation du débit sanguin dans un organe lorsque le métabolisme de ce dernier est augmenté. Par exemple, au niveau du muscle strié squelettique, une augmentation de l'activité métabolique sera proportionnelle à une augmentation du débit sanguin dans le

muscle. Il est à noter que l'hyperémie active est due à une vasodilatation des artérioles et ceci indépendamment de la libération de médiateurs ou d'hormones à travers des structures proches (sang, cellules endothéliales, ou terminaisons nerveuses péri-vasculaires).

En fait, ce sont des modifications chimiques du liquide extracellulaire en contact avec les artérioles qui vont induire la vasodilatation. Ces modifications proviennent de l'augmentation du métabolisme des cellules proches des artérioles. Voici quelques exemples de ces modifications : diminution de la concentration en O_2 , l'augmentation de la concentration en CO_2 , des ions H^+ et K^+ , de métabolites tel que l'adénosine, d'eicosanoïdes (dérivés de l'acide arachidonique tels que les prostaglandines, les leukotriènes, le thromboxane et des époxydes), ou encore, la bradykinine. Signalons que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), provenant des anions superoxydes d'origine mitochondrial, a également un effet vasodilatateur permettant une adaptation du débit aux besoins métaboliques. L'hyperémie active se manifeste surtout dans les muscles squelettiques et les glandes qui subissent des modifications importantes de leur métabolisme.

2.1.2.1. L'hyperémie réactionnelle post-occlusive (HRPO)

L'ischémie locale secondaire à l'arrêt provisoire de la perfusion d'un tissu ou d'un organe provoque dans le liquide interstitiel, l'accumulation de métabolites et de facteurs physico-chimiques inducteurs d'une vasodilatation lorsque l'occlusion est levée. Plusieurs médiateurs sont impliqués dans la HRPO : l'hyperosmolarité, l'augmentation des concentrations en CO_2 , ions K^+ , ions H^+ , ATP, adénosine et prostaglandines ainsi que l'hypoxie. Ces mécanismes impliqués dans cette hyperémie réactionnelle post-occlusive sont partiellement connus. Il a été montré que l'hypoxie entraîne la libération endothéliale de substances vasodilatrices

comme le NO, la prostacycline et peut être du facteur hyperpolarisant endothélial (Endothelial Hyperpolarizing Factor, ou EDHF). La vasodilatation pourrait aussi être favorisée par une inhibition de la libération de neuromédiateurs vasoconstricteurs par les terminaisons nerveuses sympathiques périvasculaires.

2.1.3. Réactions à une lésion vasculaire

L'inflammation consécutive à une lésion est associée à une libération d'hormones et de facteurs chimiques variés qui vont induire des réactions vasculaires locales. Parmi les molécules impliquées, on cite: l'histamine, la sérotonine, les eicosanoïdes ainsi que le facteur d'activation plaquettaire (Platelet Activating Factor ou PAF). Le NO est indirectement impliqué puisque sa libération est stimulée par de nombreuses substances inflammatoires. L'ensemble de ces substances provoque une relaxation du MLV et donc une vasodilatation dans les territoires lésés (sièges du processus inflammatoire) (Figure.3).

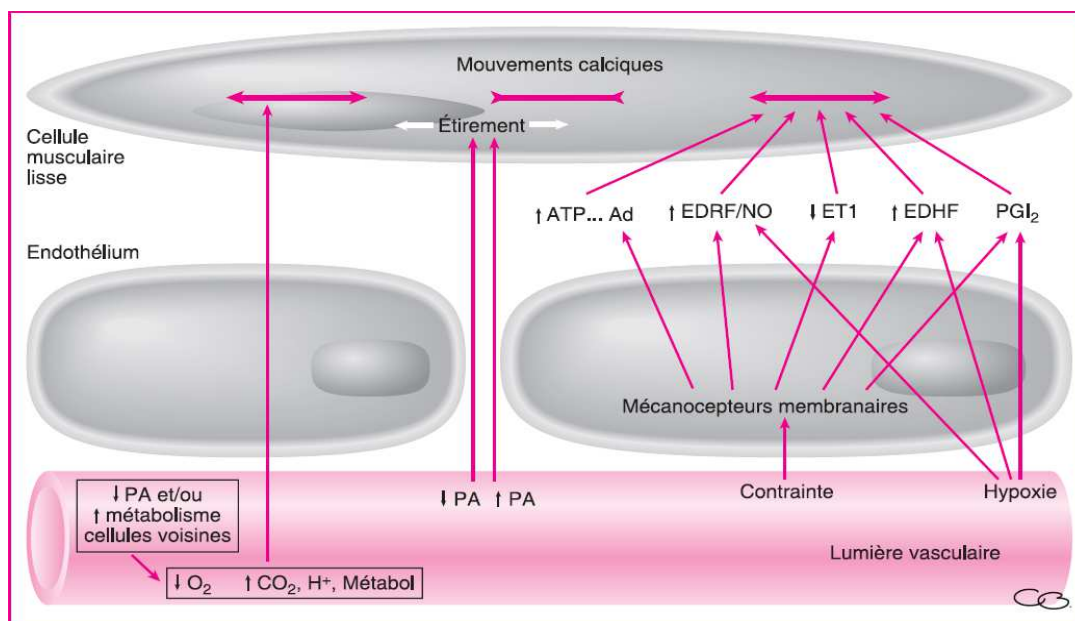


Figure 3 : Schéma de l'autorégulation du débit sanguin local par action sur les cellules musculaires

lisses : hyperémie active et hyperémie post-occlusive. Saïag B, (2009).

ATP: adénosine triphosphate, Ad : adrénaline, EDRF/NO : endothelium derived relaxing factor/NO, ET1 : endothéline 1, EDHF : endothelium derived hyperpolarising factor, PGI2 : prostacycline, PA : potentiel d'action, O₂ : oxygène, CO₂ : dioxyde de carbone

2.2. Contrôle extrinsèque

La paroi vasculaire reçoit en permanence des informations nerveuses ou hormonales. Ces informations sont le reflet de la modification siégeant à distance du MLV (d'où le terme « extrinsèque »). Ces contrôles extrinsèques dépendent de deux constituants de la paroi vasculaire et qui ont la possibilité de moduler l'état contractile du MLV. Ces deux constituants sont les terminaisons nerveuses périvasculaires d'une part, et l'endothélium vasculaire d'autre part. Il est à noter que certains mécanismes de la modulation endothéliale ont des points communs avec ceux du contrôle intrinsèque.

2.2.1. Contrôle extrinsèque « strict »

C'est un contrôle d'origine extravasculaire qui intervient dans la redistribution du débit sanguin entre différents territoires vasculaires. Ce contrôle est assuré par des mécanismes réflexes et il est responsable de la régulation à court terme de la pression artérielle. Par ailleurs, la régulation à long terme de la pression artérielle est gérée par une régulation hormonale.

2.2.2. Innervation péri-vasculaire, innervation sympathique et contrôle du tonus vasculaire

Des neurones post-ganglionnaires sympathiques se terminent au niveau de l'adventice et correspondent à des terminaisons nerveuses périvasculaires. L'importance de ces terminaisons varie selon les organes. En réponse à des potentiels d'action, à partir de l'extrémité présynaptique, les vésicules libèrent par un mécanisme d'exocytose des neuromédiateurs, tel

que la noradrénaline. Le neuromédiateur aura plusieurs rôles ; soit il va agir sur des récepteurs cytoplasmiques des cellules musculaires lisses vasculaires, soit il va être métabolisé, soit il va être repris (uptake) par l'élément présynaptique. Dans le cas de l'interaction avec des récepteurs post-synaptiques (au niveau du MLV), la noradrénaline va agir sur des récepteurs α spécifiques et induire une vasoconstriction. Parallèlement, la noradrénaline pourra agir sur des récepteurs β_2 et induire une vasodilatation. Le rapport récepteurs α_1/β_2 des récepteurs présents sur la membrane cellulaire musculaire lisse intervient dans l'organe. Lorsque ce rapport est supérieur à 1 comme dans les reins, la peau ou le tube digestif, la vasoconstriction est favorisée, et lorsqu'il est inférieur à 1 comme dans le cœur et les muscles squelettiques, c'est la vasodilatation qui est prépondérante.

Certes, la noradrénaline est le principal neuromédiateur libéré par les terminaisons nerveuses périvasculaires. Mais il n'est pas le seul : le neuropeptide Y, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) et l'ATP sont ainsi libérés en même temps que la noradrénaline et on parle de « polyneurotransmission ». L'ATP agissant sur des récepteurs purinergiques P2x, et le neuropeptide Y ont des effets vasoconstricteurs. Par ailleurs, des exonucléotidases dégradent l'ATP en ADP et adénosine, qui se fixent respectivement sur les récepteurs purinergiques P2y et P1 de la membrane musculaire lisse vasculaire pour induire des effets vasodilatateurs. La libération de neuromédiateurs contenus dans les vésicules pré-synaptiques est modulée par des mécanismes de rétrocontrôles négatifs et positifs, induits soit par les neuromédiateurs eux-mêmes, soit par d'autres molécules. Ainsi, la noradrénaline peut freiner sa propre libération via des récepteurs α_2 pré-synaptiques ou la faciliter à travers des récepteurs β_2 pré-synaptiques. D'ailleurs, la libération de noradrénaline est potentialisée par l'angiotensine II et

inhibée par le NO, par l'ACh, par l'adénosine et par certains autacoïdes inflammatoires. Ainsi, en libérant du NO, de l'ATP et de l'adénosine, les cellules endothéliales participent au contrôle de la libération des neurotransmetteurs par les terminaisons nerveuses péri-vasculaires. Il est à signaler qu'au niveau du muscle strié squelettique et de certaines glandes sudoripares, des fibres (ortho)-sympathiques pré-ganglionnaires est libérée de l'ACh qui, à son tour, va induire indirectement à travers un mécanisme paracrine une vasodilatation. Aussi, la vasodilatation musculaire et la sudation s'expliquent lorsque le système sympathique est stimulé comme par exemple lors d'un exercice musculaire.

De plus, il existe peu de fibres pré-synaptiques parasympathiques au niveau de l'adventice (si ce n'est au niveau des tissus génitaux érectiles, de vaisseaux cérébraux, pulmonaires et coronaires ainsi que de certaines glandes).

Le neuromédiateur libéré, l'ACh va pouvoir agir à plusieurs niveaux : soit en freinant la libération de noradrénaline par les terminaisons nerveuses péri-vasculaires soit en se fixant sur des récepteurs muscariniques M2 présynaptiques, soit en se fixant sur des récepteurs muscariniques M1 et M3 de la surface intinale soit en stimulant par des voies de signalisations appropriées la production de NO, de PGI₂ et/ou d'EDHF. Ces couplages vont être différents selon le lit vasculaire concerné (Saïag et coll. 2004, Saiag, 2009). Cette action se fait en synergie avec seul de l'ADP et de l'adénosine pour induire une relaxation du muscle lisse.

3. Physiologie de la vasomotricité endothélium-dépendante

La physiologie de la vasomotricité endothélium-dépendante est la partie prenante de la régulation de la vasomotricité qui est le contrôle extrinsèque du diamètre vasculaire.

L'endothélium vasculaire est formé d'une monocouche de cellules endothéliales qui tapisse les cavités internes (luminale) des artères, des veines, des capillaires, des lymphatiques, mais aussi les cavités cardiaques (on parle d'endocardium) (Camilleri et coll., 1987).

L'endothélium détecte en permanence les variations de nombreux paramètres et transmet aux cellules sous-jacentes des informations adaptées pour répondre à ces changements. De même que le système hypothalamo-hypophysaire, il est considéré comme le chef d'orchestre des nombreuses fonctions endocrine. Ainsi, de nos jours, l'endothélium est considéré comme un élément essentiel de l'activité vasculaire.

3.1. Les différentes fonctions de l'endothélium

En dehors de sa propriété modulatrice de la vasomotricité, l'endothélium a d'autres propriétés qui sont rapidement énumérées ici :

- Il intervient dans l'angiogenèse et la néovascularisation ;
- Il contrôle le transport de molécules entre le plasma et le liquide interstitiel ;
- Il contrôle la perméabilité capillaire ;
- Il influence la prolifération des cellules musculaires lisses dans l'athérosclérose ;
- Il secrète des substances qui régissent l'agrégation plaquettaire et la coagulation ;
- Il synthétise, dégrade et élimine des hormones et des médiateurs ;

- Il a des fonctions comparables à celles des macrophages lors des processus immunitaires.

De plus, il faut retenir que l'endothélium subit des modifications importantes dans certaines pathologies et dans différentes conditions. Ainsi, l'endothélium présente les caractéristiques d'un organe qui possède une multitude de fonctions biologiques comme le maintien de l'équilibre entre la coagulation et de la fibrinolyse, l'expression des molécules d'adhésion des cellules dans le système immunitaire, le métabolisme de la noradrénaline et de la 5-hydroxytryptamine, et de la conversion de l'angiotensine I et la bradykinine (Stankevicius et coll 2003). Il est à noter que les cellules endothéliales qui se veulent des cellules pavimenteuses, sont allongées dans le sens de l'écoulement du sang. Elles sont recouvertes d'un glycocalix qui est riche en protéoglycanes et très électronégatif. La présence de ces protéoglycanes empêche l'adhésion et l'agrégation des plaquettes qui sont chargées négativement. L'endothélium comprend la membrane basale et le sous endothélium. La membrane basale permet l'ancrage aux cellules endothéliales qui la secrètent. Le dernier composant de l'intima est une charpente rigide synthétisée par l'endothélium. Elle est riche en collagène de type III formant des fibres striées concentriques et elle est également riche en élastine. Les cellules endothéliales réagissent à de nombreuses molécules transportées par le sang, au contact avec des éléments figurés et enfin aux variations des pressions (shear stress) que le flux sanguin exerce sur l'intima. Ce sont les forces de cisaillement, qui déterminent l'orientation des cellules endothéliales. Par ailleurs, la surface lisse de l'intima minimise les frottements et améliore, en conséquence, l'écoulement sanguin. Mis à part ce rôle considérable dans la physiologie cardiovasculaire et le contrôle du tonus artériel, les cellules

endothéliales régulent l'agrégation plaquettaire, la fibrinolyse, le remodelage des vaisseaux sanguins et la perméabilité vasculaire (Libby et coll., 2002 ; Saiag et coll, 2004 ; Pellegrin et coll., 2008). L'endothélium est également impliqué dans les processus d'angiogenèse et de néovascularisation tumorale ou non. En effet, c'est à partir des cellules endothéliales que vont s'initialiser les ramifications de nouveaux vaisseaux (Saiag et al, 2004). Enfin c'est au niveau de la jonction MLV-endothélium que se forme la plaque d'athérome selon un mécanisme favorisé par différents facteurs. Il intervient dans le contrôle de la vasomotricité par la régulation du tonus vasculaire, du calibre, du flux sanguin (Behrendt et Ganz, 2002) et la production de substances vasodilatatrices comme le NO, la prostacycline (PGI₂) et l'EDHF et de substances vasoconstrictrices telles que l'endothéline-1 (ET1) et la thromboxane A₂ (TXA₂) (Vallance, 2001). L'endothélium secrète et synthétise des substances vasocatives (vasoconstrictrices et vasodilatatrices) qui interviennent dans le maintien, en équilibre (en conditions physiologiques normale), du tonus vasculaire. Parmi ces différentes substances on a le NO, les prostacyclines, l'endothéline (Wenzel et al. 1994) et l'angiotensine II (Pellegrin et coll, 2008) (Fig.4).

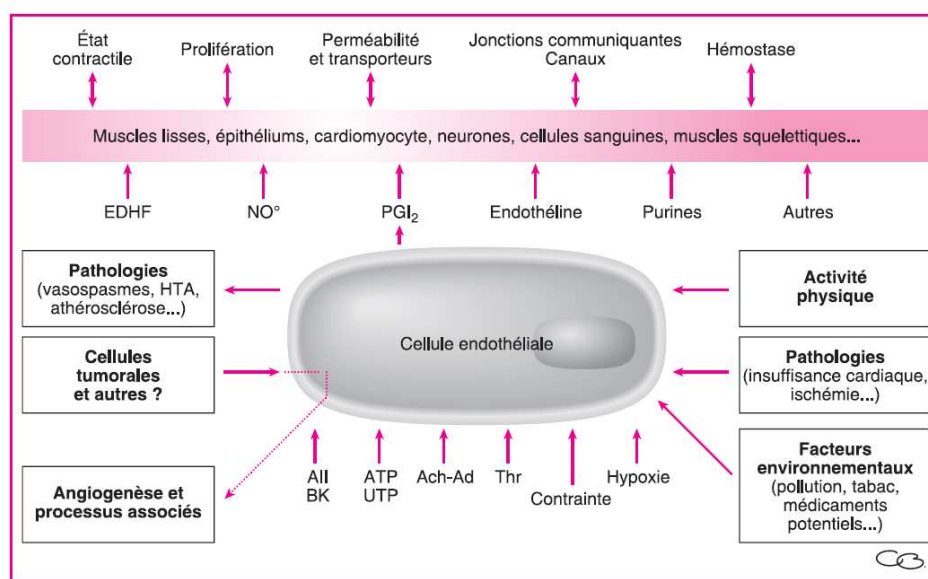


Figure 4 : Schématisation des effets de différents facteurs environnants sur la réponse endothéliale

(Saiag B, 2009)

3.2. Facteurs endothéliaux vasodilatateurs

Depuis les travaux de Furchgott et Zawadski (1980), les recherches en physiologie et en pharmacologie de la paroi vasculaire ont fortement fait évoluer nos connaissances relatives aux mécanismes modulateurs de l'état contractile du muscle lisse vasculaire. Les différentes études scientifiques ont révélé que l'endothélium peut moduler le tonus du muscle lisse vasculaire par la synthèse et la libération des facteurs vasorelaxants et/ou des facteurs vasoconstricteurs. Par ailleurs, l'enzyme de conversion, présent sur la membrane des cellules endothéliales, transforme d'une part l'angiotensine I circulante et inactive en angiotensine II (vasoconstrictrice), et d'autre part la bradykinine active (vasorelaxante) en peptides inactifs. Donc, suite à l'activité de l'enzyme de conversion, l'endothélium a un effet globalement hypertenseur.

3.2.1. La prostacycline (prostaglandine PGI₂)

Elle est synthétisée par une cyclo oxygénase et une PGI₂ synthétase, puis libérée par les cellules endothéliales. Cet agent vasodilatateur va stimuler des récepteurs spécifiques situés au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules musculaires lisses, puis induire une augmentation d'AMP cyclique, responsable de la relaxation (Vane et coll, 1979).

3.2.2. L'Endothelium Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF)

ATP: adénosine triphosphate, ADP: adénosine diphosphate, Ad: adrénaline, EDRF/NO: endothelium derived relaxing factor/NO, ET1: endothéline 1, EDHF: endothelium derived hyperpolarising factor, PGI2: prostacycline, PA: potentiel d'action, O₂: oxygène, CO₂: dioxyde de carbone.

3.2.3.1. Biosynthèse du NO

En 1980, Furchgott et Zawadski expliquent que sous l'effet du carbachol (analogue de l'ACh) l'endothélium sain est produit à partir de l'EDRF. C'est en 1986 que cette molécule a été reconnue comme molécule biologique par Ignaro et Murad. Ce gaz incolore est présent dans l'atmosphère en faible quantité. Du point de vue chimique, le NO est un composé radicalaire liposoluble (qui a une durée de vie très courte de 6 à 10 secondes), donc traversant les membranes, il diffuse dans les cellules du muscle lisse vasculaire voisines pour activer la guanylate cyclase soluble, laquelle produit la guanosine monophosphate cyclique (GMP cyclique) (un second messenger) pour induire une relaxation (Roberts AC and Porter KE, 2013). Dans les conditions physiologiques standards, la production du NO est déclenchée par les forces de cisaillement liées au flux sanguin. De nombreuses substances paracrines et endocrines stimulent la libération de l'EDRF par l'endothélium. La cellule endothéliale stimulée par les forces de cisaillement (shear-stress) et de la tension pariétale synthétise et libère le NO suite à l'augmentation du flux sanguin. Le NO est une molécule extrêmement instable ayant une très courte durée de vie biologique et dont l'action est purement locale (Moncada et Higgs, 1993 ; Dinh-Xuan et coll, 1998). C'est un radical constitué d'un atome d'azote et d'un atome d'oxygène liés par une double liaison (Fig.6).

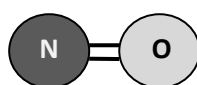


Figure 6. Structure chimique du NO

Le NO résulte de la transformation de la L-arginine, un acide aminé, en une substance non active (Avogaro et coll, 2006). C'est une oxydation de la L-arginine par la NO-synthase constitutive de type endothéliale (NOS_e) (Collin et Levy, 2008). Au niveau cellulaire, cette transformation engendre soit la L-citruline et le NO, soit la L-ornithine et l'urée (Avogaro et coll, 2006). Le NO est formé à partir de l'un des deux atomes d'azote terminaux, chimiquement équivalents du groupement guanidine de la L-arginine d'une part et de l'oxygène moléculaire (O₂) d'autre part (Moncada et Higgs, 1993). En revanche, la L-citrulline est formée de manière stoechiométrique avec le NO qui provient de l'hydroxylation de la L-arginine en N^G-hydroxyl-L-arginine (Dinh-Xuan, 1996). Il existe au moins 3 isoformes de la NOS codées par 3 gènes distincts localisés sur les chromosomes 7, 12 et 17 et différentes entre elles par leurs localisations cellulaires, leurs fonctions et leur caractéristiques biochimiques. Les 3 isoformes de la NOS sont la NOS endothéliale (NOS_e), la NOS neuronale (NOS_n) et la NOS inductible ou inflammatoire (NOS_i) ; 50% des séquences de ces enzymes sont homologues (Alderton et al, 2001). La forme active des NOS ne peut être que sous la forme d'un dimère. La mise en place de cette activation nécessite la présence des cofacteurs allostériques comme le (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobioptérine (BH₄), la flavine mononucléotide (FMN), la flavine adénine dinucléotide (FAD), l'hème, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et la calmoduline (Alderton et coll, 2001 ; Avogaro et coll, 2006).

3.2.3.2. Isoformes de la NOS

i. La NOSi

Demande la présence de la calmoduline pour la synthèse du NO, dont l'activation est indépendante de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} pour permettre à l'isoforme macrophagique de produire des quantités élevées du NO pendant une longue période. Cependant, les formes constitutives le produisent en faible quantité pendant une courte période (Dallaire et Marette, 2004). Contrairement aux NOSs constitutives, l'expression du NOSi appelé aussi NOS-2 ou isoforme macrophagique demande la présence des facteurs inflammatoires ou pro-immuns tels que les cytokines et les endotoxines (Dallaire et Marette, 2004).

ii- La NOSn

Découverte en 1991 chez les rats, la première isoforme identifiée. la NOSn est appelée aussi NOSb, NOSnc ou NOS-1. Elle est exprimée sous plusieurs fractions telles que la NOSn α , la NOSn β , la NOSn γ , la NOSn μ (Alderton et coll, 2001). Cette forme neuronale est exprimée de façon constitutive au niveau du muscle squelettique (Nakane et al, 1993 ; Wheatcroft et coll, 2003) ; de.s fibres musculaires de type IIb (Kapur et coll, 1997) ; du système nerveux central, où le NO agit comme un neurotransmetteur (Son et coll, 1996) ; du cœur où le NO est impliqué dans la modulation des fonctions contractiles (Reid, 2006) et neuromusculaires (Ribera et coll, 1998 ; Mungrue et coll, 2002) ; des îlots pancréatiques et des cellules bêta en contrôlant la sécrétion de l'insuline (Lajoix et coll, 2001) ; des hépatocytes où il intervient dans la circulation sanguine hépatique et dans les activités hépatobiliaires (Esteban et coll, 1997 ; Wei et coll, 2002). Le NO produit à partir de la NOSn agit comme neurotransmetteur

au niveau des neurones périphériques pour agir sur le système : gastro-intestin, respiratoire et génito-urinaire (Moncada, 1992 ; Christopherson et coll, 1997).

iii- La NOSe

Appelée aussi NOSec ou NOS-3 est exprimée de façon constitutive dans les cellules endothéliales, au niveau du cœur et du foie (Mungrue, 2002 ; Shah et coll, 1997) ; du pancréas (Moncada et coll, 1991 ; Alderton et coll, 2011) ; du muscle squelettique (Kapur et coll, 1997 ; Perreault et Marette, 2001) et du tissu adipeux (Kapur et coll 1997). L'activité de la NOSe peut être augmentée soit par des médiateurs comme l'ACh et la bradykinine, soit par des hormones comme l'insuline ou encore par des stimuli mécaniques comme les forces de cisaillement et l'hypoxie (Naderali et coll, 2001 ; Wheatcroft et coll, 2003) Cette isoforme est composée de deux protéines globulaires comprenant un domaine réductase en C-terminal et un domaine oxygénase en N-terminal connectés par une protéine flexible (Fig.7).

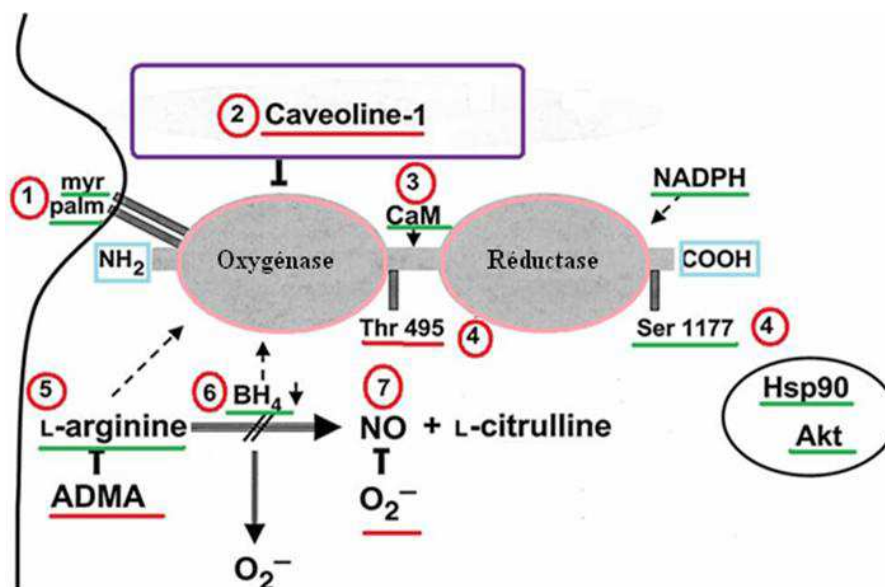


Figure 7. Voie de synthèse du monoxyde d'azote par la NOS d'origine endothéliale

(Behrendt et Ganz, 2002)

3.2.3.3. Modalités de biosynthèse du NO d'origine endothélial

Les cellules endothéliales produisent le NO à partir de la NO synthase endothéliale (NOSe ou NOS III). L'activation de la NOSe est régulée par plusieurs facteurs comme les changements de la concentration cellulaire de Ca^{++} qui influence sa liaison avec la calmoduline qui est présente en grande quantité dans les cavéolae (Walford et Lascalzo, 2003 ; Domenico, 2004). D'autre part, l'activation de la NOSe est stimulée par certains agonistes comme l'ACh, la bradykinine et/ou d'autres stimuli mécaniques comme le « shear-stress ». La liaison de ces substances ou du shear stress à leurs entités réceptrices va entraîner une augmentation de la libération du Ca^{2+} intracellulaire puis sa liaison à la calmoduline. Ce complexe entre en compétition avec la cavéoline liée à la NOSe. Le complexe Ca^{2+} -calmoduline-NOSe va entraîner une modification de la configuration de la NOSe qui va être activé et va conduire à la synthèse du NO (Montagnani et coll, 2001 ; Vincent et coll, 2003) (Fig.8).

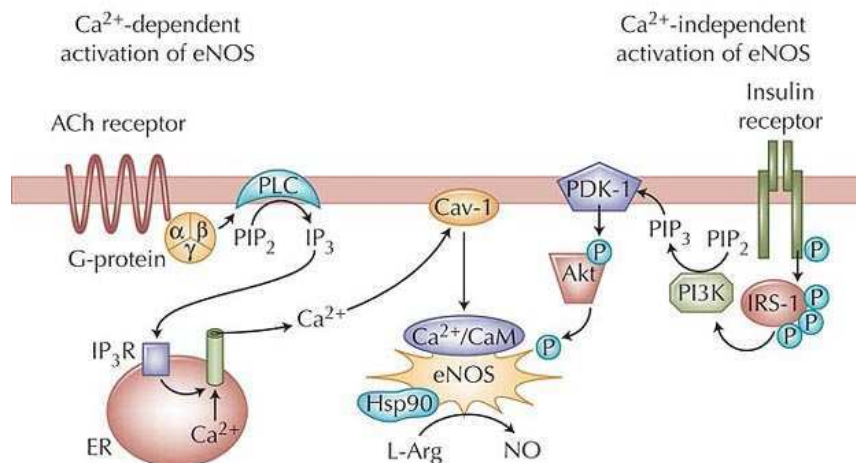


Figure 8. Voie d'activation de la NOSe dépendante ou indépendante du calcium.

(Vincent et coll, 2003)

3.2.3.4. Diffusion et mécanismes d'action du NO

Une fois synthétisé, le NO diffuse rapidement vers la face luminale de l'endothélium puis dans la lumière vasculaire, dans le but d'inhiber l'agrégation et l'adhérence des plaquettes à la paroi des vaisseaux sanguins (Avogaro et coll, 2006). La diffusion du NO vers le coté basal de l'endothélium va entraîner la relaxation du muscle lisse vasculaire sous-jacent. Le NO va stimuler l'activité de la guanylate cyclase soluble pour synthétiser le GMP cyclique (GMPc) au niveau des cellules du muscle lisse vasculaire. L'augmentation de la concentration du GMPc active les protéines kinases G (PKG) de type I qui contrôlent directement ou indirectement la contractilité des cellules du muscle lisse vasculaire. L'activation des PKG par le GMPc a de nombreux effets comme par exemple l'induction de la phosphorylation de la phospholamban (PLb), qui est une protéine inhibitrice de la pompe calcium/ATPase de la membrane du réticulum endoplasmique. Cette phosphorylation favorise les mouvements de re-captage du calcium dans les compartiments intracellulaires depuis le cytosol en levant l'inhibition de la pompe calcium/ATPase. Cette levée d'inhibition entraîne une vasorelaxation et une relaxation au niveau du muscle lisse vasculaire. L'activation des PKG par le GMPc induit l'ouverture des canaux potassiques provoquant un efflux d'ions K^+ et l'hyper polarisation de la membrane cellulaire. La voie finale commune de ces réactions de phosphorylation dépendante des PKG est la diminution de la concentration intracytosolique d'ions Ca^{2+} , responsable de la vasorelaxation (Fig.9).

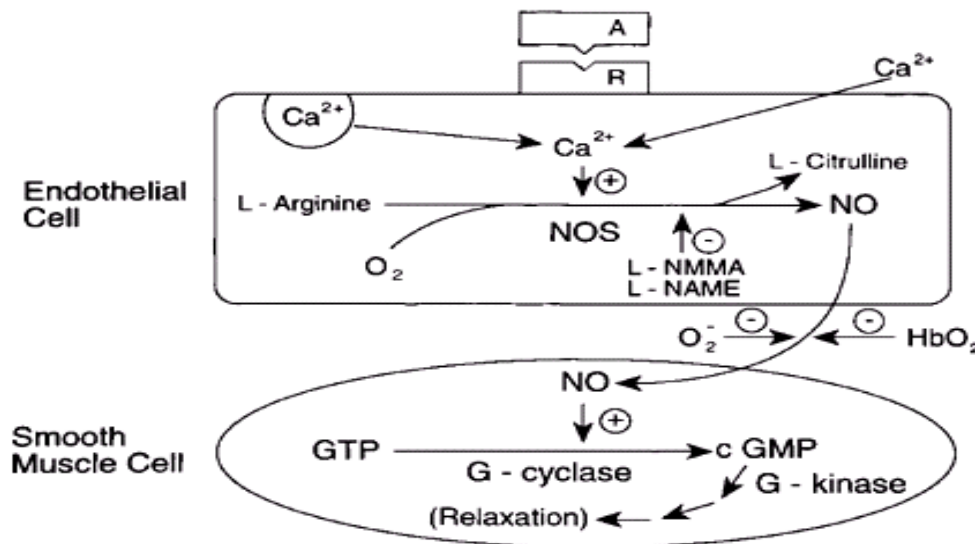


Figure 9 : Mécanisme d'action du NO (Saïag B et coll. 2004)

Ca^{2+} : calcium, GTP : guanine triphosphate, GMPc : guanine monophosphate cyclique.

De ce fait, le NO induit une relaxation du muscle lisse vasculaire mais il est aussi à l'origine d'une cytotoxicité pour tous les types cellulaires. Ainsi, le NO est donc à l'origine d'activation et/ou d'induction d'autres enzymes qui produisent des radicaux dérivés de l'oxygène. L'aspect ambivalent des fonctions biologiques du NO n'est pas tant lié à sa nature chimique qu'à la nature de la cible moléculaire extrêmement instable et qui peut être captée facilement par des protéines comme l'hémoglobine, l'anion superoxyde (O_2^-). Le produit de combinaison du NO avec l'anion superoxyde donne naissance à un autre radical nitro-oxygéné qui est le peroxynitrite ($ONOO^-$). C'est une molécule très réactive impliquée, entre autres dans la genèse de nombreuses pathologies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer).

Le NO endothélial a des effets protecteurs tels que : le maintien du tonus vasculaire basal par la relaxation des cellules du muscle lisse vasculaire ; inhibition de l'adhésion, l'activation, la sécrétion et l'agrégation plaquettaire. Il facilite ainsi la désagrégation plaquettaire (Arshed, 1998), l'inhibition de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, l'inhibition de la

migration et de la prolifération des cellules musculaires (Anderson, 2003). le NO : 1- est un puissant inhibiteur de tous les mécanismes aboutissant à la prolifération néointimale et à l'athérosclérose (Avogaro et coll, 2006) ; 2- il est impliqué dans la régulation de la pression sanguine et du flux sanguin ; 3- agit sur la transcription des gènes qui inhibent l'expression de nombreuses molécules d'adhésion au niveau des cellules endothéliales et des plaquettes (Armstead et coll, 1997) 4- il inhibe l'expression de l'ARNm du Monocyte chemoattachant protein-1 (MCP-1) (Busse et Fleming, 1995).

3.2.4. L'ADP, l'ATP, l'AMP, l'adénosine et les récepteurs purinergiques

Certes, l'ATP peut être libérée non seulement par les terminaisons nerveuses péri-vasculaires mais aussi par l'endothélium vasculaire et par les plaquettes sanguines. Une fois libérée, l'ATP peut être dégradée par des ectonucléotidases et transformé en ADP, en AMP et en adenosine. Ces purines vont agir soit sur le MLV ; soit sur l'endothélium au niveau de récepteurs spécifiques appelés récepteurs purinergiques.

Il a été démontré que les nucléotides et nucléosides puriques et parfois pyrimidiques ont des effets importants sur les membranes de systèmes excitables.

En 1929, Drury et Szent-Györgyi avaient noté l'implication de l'adénosine dans la baisse générale de la pression artérielle et la dilatation des vaisseaux coronaires. Depuis lors, la liste des actions des nucléotides extracellulaires n'a cessé de s'allonger et tous les systèmes physiologiques de l'organisme sont concernés (Sevigny et coll. 1994). De nombreuses recherches ont démontré, que non seulement les purines (ATP, ADP, AMP et adénosine) sont

présentes dans l'environnement immédiat du muscle lisse vasculaire et sont d'origine endogène. Ces molécules régulent l'état contractile des vaisseaux. Les purines sont libérées par les terminaisons nerveuses adrénérergiques et cholinérergiques, par les cellules endothéliales, par les cellules musculaires lisses vasculaires, mais aussi par les cellules sanguines (les plaquettes, granulocytes neutrophiles, etc.). Comme les autres catégories de récepteurs, la classification pharmacologique des récepteurs purinérergiques ne cessent d'évoluer. En 1976, Burnstock a défini une sous-classe de récepteurs purinérergiques P1 et étudié leurs caractéristiques physio-pharmacologique. Ces récepteurs sont directement impliqués dans la relaxation du muscle lisse par l'adénosine. En 1978, Burnstock introduisit le concept selon lequel les actions des nucléotides extracellulaires sont relayées par des récepteurs spécifiques, dit récepteurs « purinérergiques P2 », plus sensibles à l'ATP/ADP qu'à l'adénosine alors que les récepteurs « purinérergiques P1 » sont plus sensibles à l'adénosine/AMP qu'à l'ATP/ADP. Les récepteurs P2 sont directement impliqués dans la vasoconstriction du muscle lisse par l'action des purines (ATP, ADP, AMP) et les pyrimidines (UDP, UTP). Plusieurs sous groupes de récepteurs P2 ont été individualisés ultérieurement, sur la base de la nature des effets observés et des mécanismes de transduction sous-jacents. Au niveau du système cardiovasculaire, les principaux récepteurs P2 impliqués dans la vasomotricité sont les P2x, P2y et à moindre degré les P2u. L'innervation des muscles lisses vasculaires est assurée majoritairement par des terminaisons nerveuses noradrénérergiques, plus rarement cholinérergiques, et parfois par des terminaisons nerveuses ni Noradrénérergiques ni Cholinérergiques. L'ATP est stockée et libérée par ces trois types de terminaisons nerveuses péri-vasculaires. Il a été démontré qu'il existe une co-transmission de l'ATP avec, d'une part

l'acétylcholine et, d'autre part la noradrénaline. En outre, il a été prouvé également que l'ATP module par rétrocontrôle négatif la libération de noradrénaline (NA) à partir des terminaisons péri-vasculaires. Ce sont des récepteurs purinergiques de type P1, présents au niveau des terminaisons noradrénergiques, qui interviennent dans cette modulation. Par ailleurs, l'ATP, libérée à la jonction neuromusculaire vasculaire avec l'acétylcholine va agir directement sur des récepteurs P2 du MLV ou encore être dégradée par des ectonucléotidases en adénosine et interagir avec ses récepteurs P1 vasculaires. Cependant, l'ATP et l'ADP peuvent agir sur les récepteurs musculaires lisses P2x pour induire une vasoconstriction ou, au contraire, agir sur les récepteurs endothéliaux P2y pour induire une vasodilatation (via la libération de NO, PGI₂, EDHF...). Ces actions participent au maintien du tonus vasculaire physiologique (Pitré et coll, 1998).

3.3. Facteurs endothéliaux vasoconstricteurs

L'endothéline (ET1) est synthétisée à partir de la big-endotheline par une enzyme de conversion endothéliale (Yanagisawa et coll, 1988 ; Vallance, 2001). Une fois libérée, elle agit sur deux types de récepteurs, ETA et ETB, situés sur la membrane de la cellule musculaire lisse vasculaire. L'activation des récepteurs ETA va induire une baisse des taux d'AMP cyclique, d'où une vasoconstriction. Les récepteurs ETB, qui sont également localisés sur la paroi des cellules endothéliales, sont capables de stimuler la production de NO et de prostacycline.

Les radicaux libres à faible concentration, stimulent la cyclo-oxygénase et la prostacycline synthétase, et donc induisent une vasodilatation. En revanche, à forte concentration, ils

inactivent le NO et inhibent la production de prostacycline. La production de thromboxane A₂ n'est pas inhibée et celui-ci conserve son effet vasoconstricteur.

L'endothélium produit de nombreuses substances vasoconstrictrices telles que l'Endothéline-1 (ET-1) et la Thromboxane A₂ (TXA₂) (Vallance, 2001). Nous développerons plus précisément des données relatives à l'ET-1. C'est un peptide de 21 acides aminés qui a été isolée par Yanagisawa en 1988 à partir de cultures de cellules endothéliales d'aorte de porc (Yanagisawa et coll, 1988). L'ET est synthétisée à partir de la « Big Endothelin » sous l'effet d'une enzyme de conversion. Elle possède au moins trois isoformes nommées respectivement ET-1, ET-2 et ET-3. Parmi ces trois isoformes on note que l'ET-1 est un puissant vasoconstricteur. C'est l'unique isoforme libérée par les cellules endothéliales vasculaires et qui joue un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire. L'ET-1 est libérée principalement (environ 80%) en direction du muscle lisse vasculaire (Wagner et coll, 1992). La demi-vie de l'ET-1 est très courte (environ 1 minute), une grande partie se trouvant dans la circulation est rapidement éliminée par les poumons et les reins (90% d'ET-1) (De Nucci et coll, 1988).

L'ET-1, l'ET-2 et l'ET-3 agissent en se liant à des récepteurs membranaires à savoir l'ET_A et l'ET_B. On note une plus grande affinité de l'ET-1 pour le récepteur ET_A (100 fois supérieure que pour l'ET-3). C'est en se liant à son récepteur spécifique que l'ET-1 produit ses effets biologiques et donc responsable des effets vasoconstricteurs. De ce fait, il est important de noter que le récepteur ET_A est principalement exprimé dans les cardiomyocytes et les cellules musculaires lisses vasculaires mais il n'est pas présent dans les cellules endothéliales vasculaires (Haynes et al, 1998). En revanche, le récepteur de type B est exprimé

principalement dans les cellules endothéliales vasculaires et épithéliales tubulaires du néphron. Il est présent en faible quantité (5 à 10%) dans les cellules du muscle lisse vasculaire. Cette grande densité de récepteurs ET-B au niveau de l'endothélium va permettre, lorsqu'ils sont stimulés, la libération de facteurs relaxants tels que le NO et la PGI₂. Ainsi, ils s'opposent aux effets vasoconstricteurs médiés par le récepteur ET_A et freinent la production d'ET-1 (Hirata et coll, 1993). Dans les conditions physiologiques normales, une augmentation de la sécrétion de l'ET-1 est rapidement compensée par une libération de facteurs vasodilatateurs permettant la constance du tonus vasculaire. Le cas échéant, une dysrégulation peut altérer les réponses vasculaires et entraîner un dysfonctionnement endothélial identifiable dans certaines pathologies comme l'hypertension artérielle, l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète (Juan et coll, 1998). Dans plusieurs travaux (Takahashi et coll, 1990 ; Takeda et coll, 1991 ; Ferri et coll 1995) relatifs à des cas pathologiques (sujets diabétiques et hypertendus) des taux anormalement élevés d'ET-1 ont été observés. De plus, de nombreux facteurs peuvent stimuler la sécrétion d'ET-1. Parmi ces facteurs, citons certaines substances comme l'angiotensine II, l'adrénaline, les glucocorticoïdes et l'insuline, des médiateurs de l'inflammation (les endotoxines, les interleukines et le Tumor Necrosis Factor (TNF), des facteurs de croissances (TGF- β), des facteurs de coagulation (Thromboxane A₂) et la thrombine, et quelques stimuli mécaniques ou chimiques comme les forces de cisaillement et l'hypoxie. Chen et coll, 2000 et Khale et coll, 2000 ont démontrés sur des rats diabétiques (in vivo et in vitro) qu'un stress oxydatif (une surproduction de radicaux libres) stimule la production d'ET-1 dans les reins et dans des cultures de cellules endothéliales (Fig.10).

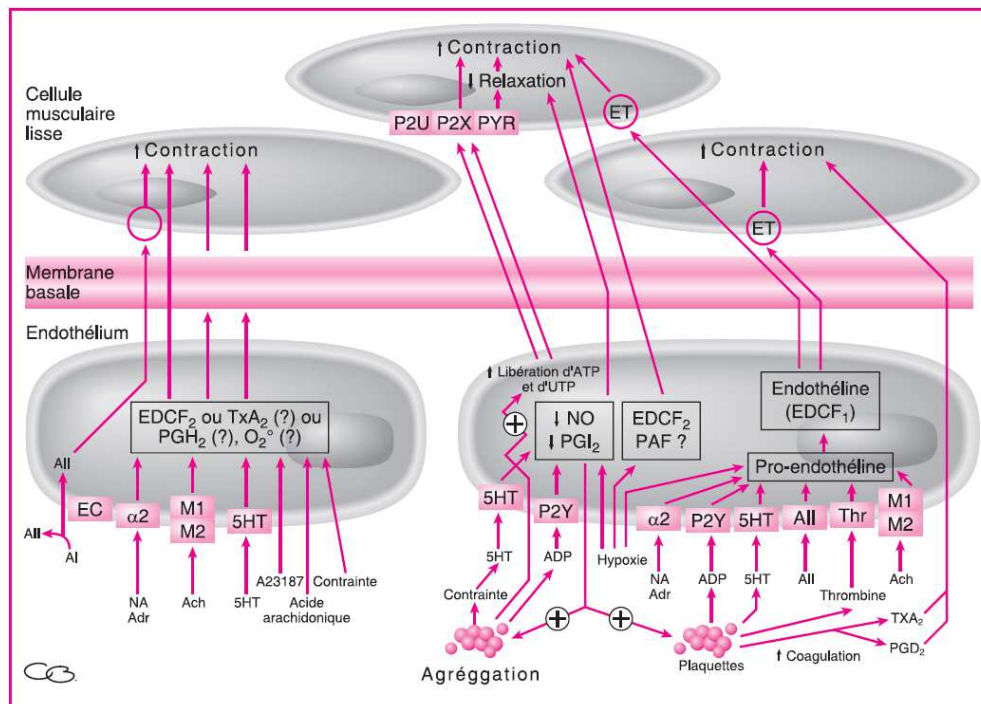


Figure 10 : Régulation de la vasoconstriction par l'endothélium vasculaire (Saiag B, 2009)

3.4. Synthèse sur la modulation endothéliale de la vasomotricité

Les libérations des différents facteurs endothéliaux régulateurs de la vasomotricité sont constamment modulées par de nombreuses molécules circulantes. Par exemple, l'ACh, par l'intermédiaire de récepteurs muscariniques endothéliaux, M1 et M2, va induire des productions de PGI₂, de NO et de l'EDHF. L'adrénomédulline est une hormone régulant la vasomotricité qui provoque une libération de NO et inhibe la production d'endothéline par les cellules endothéliales. Ainsi, le fonctionnement normal de la paroi vasculaire dépend de différents facteurs de régulation. Ceux-ci peuvent être regroupés en facteurs endothélium-dépendants (d'origine endothéliale) et en facteurs endothélium-indépendants (d'origine sanguine, musculaire lisse et nerveuse). Cette grande variété dans les mécanismes de régulation du tonus vasculaire traduit une certaine plasticité et adaptabilité fonctionnelle de la paroi vasculaire (Fig.11).

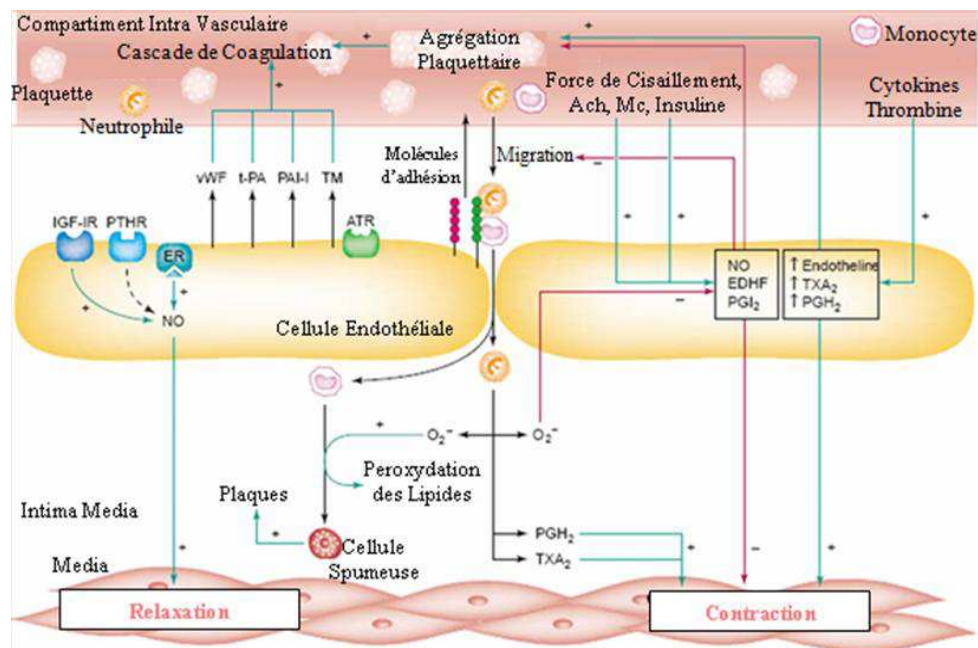


Figure 11. Différentes fonctions de l'endothélium vasculaire (Tarig et coll., 2001)

4- Les dysfonctionnements endothéliaux dans différentes pathologies

Les maladies cardiovasculaires restent de nos jours la première cause de mortalité chez la femme et la 2^{ème} cause chez l'homme après les cancers. Après avoir évoqué le rôle important que le NO joue dans le maintien de l'homéostasie vasculaire, il est nécessaire de noter qu'il a aussi des effets protecteurs (Sarr, 2004). Le diabète, l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle, le tabagisme et l'obésité sont les principaux facteurs de risques qui prédisposent à l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque (Steinberg et coll, 1996 ; Mather et coll, 2002 ; John & Schmieder, 2003). Il est à signaler que ces pathologies et ces facteurs de risques sont le plus souvent corrélés à une dysfonction de la voie du NOS endothéliale (Poredos et coll, 2002).

La dysfonction endothéliale est définie comme l'altération des fonctions régulatrices de l'endothélium, qui entraînent l'apparition de certaines pathologies (Simona Sacco et coll 2013 ; Raji et coll 2006 ; Taddei et coll, 2003). Pour ce qui concerne la vasomotricité, la dysfonction endothéliale peut conduire à un déséquilibre de la balance vasodilatateurs/vasoconstricteurs en faveur des facteurs vasoconstricteurs. La dysfonction endothéliale influence également les facteurs pro-coagulants et les facteurs pro-inflammatoires. Il y a une altération de la biosynthèse et de la libération des facteurs vasodilatateurs d'origine endothéliale ainsi que des facteurs anticoagulants et anti-inflammatoires. (Bourgoin et coll, 2006 ; Simona Sacco et coll 2013). La dysfonction endothéliale est associée à la plupart des maladies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque chronique, la maladie artérielle périphérique, le diabète et l'insuffisance rénale chronique (Endmann et coll, 2004). De ce fait, la dysfonction endothéliale est caractérisée principalement par une diminution de la réponse vasodilatatrice endothélium-dépendante via le NO, et secondairement via l'EDHF avec un excès d'oxydation (Michael E et coll, 2003 ; Endmann et coll, 2004). L'altération de la biodisponibilité du NO est la cause majeure d'un dysfonctionnement endothélial, compte tenu de la forte implication du NO/EDRF dans les fonctions régulatrices de l'endothélium (Raji et Catravas, 2008). La dysfonction endothéliale représente un indicateur important et précoce dans la pathogenèse de l'athérosclérose. On note une réduction des cellules progénitrices endothéliales circulantes (synthétisé au niveau de la moelle osseuse et dont la production est augmentée par l'activité physique). Ces cellules circulantes jouent un rôle important dans la régénération de l'endothélium et leur réduction participe à la pathophysiologie endothéliale.

Via la libération du NO et de PGI₂ et selon un mode paracrine, l'endothélium assure le contrôle de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaire. Le diabète (type 1 et 2), l'obésité, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle, l'athérosclérose et l'hypercholestérolémie sont des pathologies où on note une diminution de la biodisponibilité du NO soit par une réduction de sa production soit par une augmentation de sa dégradation (Raij et coll 2006 ; Peng et coll, 2013). C'est l'altération de l'expression et/ou de l'activité de la NOSe qui provoque une baisse de la production du NO (Duda et coll, 2004) et donc une augmentation de la production de facteurs vasoconstricteurs qui entraîne un dysfonctionnement endothélial et favorise la vasoconstriction (Simona Sacco et coll 2013). D'autre part, sous l'influence de certains facteurs de risques vasculaires (comme le vieillissement, le diabète, l'obésité, l'hypertension artérielle ...) l'endothélium subit des modifications fonctionnelles qui vont modifier ses fonctions régulatrices (Michael E et coll 2003) (Fig.12).

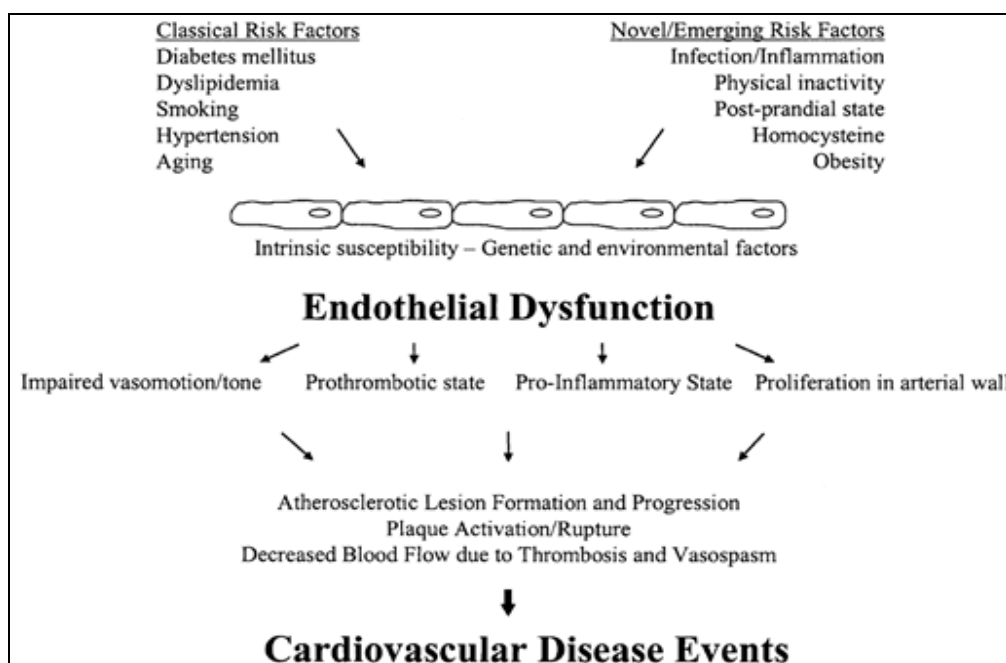


Figure 12. Rôle de la dysfonction endothéliale dans la pathogénèse des maladies cardiovasculaires (Michael et coll 2003)

Sous l'influence de nombreux facteurs de risques cardiovasculaires, l'endothélium subit des modifications et l'équilibre fonctionnel bascule en favorisant un dysfonctionnement endothélial. Ce déséquilibre survient sous l'effet d'une part de facteurs intrinsèques favorisant l'inflammation, la prolifération des cellules musculaires lisses et la thrombose (Endmann H et coll, 2004). D'autre part, sous l'effet de facteurs environnementaux comme une mauvaise alimentation, l'inactivité physique, l'obésité, le tabagisme apparaît une réduction de la biodisponibilité du NO qui est le résultat d'une diminution de l'activité de la NOSe (Rajendran et coll 2013). Ainsi, dans le processus athéromateux, l'inflammation va faciliter le passage de protéines, qui existent normalement dans le sang, à travers la paroi vasculaire vers les tissus adjacents. Certaines de ces protéines comprennent la protéine C-réactive produite par le foie et qui est un marqueur de l'inflammation (Devaraj S et coll, 2009).

Les cellules endothéliales jouent un rôle notable dans la régulation du flux sanguin grâce à leurs capacités de générer une surface anti-thrombotique active qui facilite le transit du plasma et des constituants cellulaires à travers le système vasculaire. Les perturbations telles que celles qui peuvent survenir lors des inflammations ou d'importantes contraintes de cisaillement hydrodynamiques perturbent le fonctionnement des cellules endothéliales. Elles ont un rôle important dans la régulation de la coagulation en régulant l'expression des anticoagulants et des facteurs pro-coagulants sur la surface des cellules de liaison. Au repos et en état normal, les cellules endothéliales maintiennent la fluidité du sang par l'augmentation de l'activité de nombreuses voies anticoagulantes (Rajendran et coll 2013).

4.1. Mécanismes de la dysfonction endothéliale

Bien que la pathophysiologie de la dysfonction endothéliale soit complexe, elle implique différents mécanismes. Ainsi, on note quatre origines de la baisse de la biodisponibilité du NO (Pellegrin et coll, 2008) :

- La réduction de l'expression et/ou de l'activité de la NOSe ;
- Le « découplage » de la NOSe (en l'absence du substrat L-arginine ou du cofacteur BH₄) ;
- L'augmentation de la capture ou de la dégradation du NO ;
- L'altération de la transmission des événements signalétiques initiés par le NO (Braam B et coll, 2007)

Plusieurs facteurs peuvent augmenter le nombre de radicaux libres et donc induire un stress oxydant (SO) qui conduit à l'apparition d'un dysfonctionnement endothélial (comme l'obésité, le tabagisme, la privation de sommeil, les infections microbiennes aiguës, une forte consommation de glucose, l'exposition aux métaux et aux polluants atmosphériques) (Peramaiyan et coll 2013). L'installation d'un SO entraîne une altération de la vasodilatation via une diminution de la biodisponibilité du NO. L'anion superoxide $O_2^{\circ-}$ va piéger le NO et provoquer un dysfonctionnement endothélial. Dans les conditions physiologiques normales il existe un équilibre entre la génération d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) prooxydants et leur destruction par les antioxydants (défenses enzymatiques comme les superoxydes dismutases, ...) qui protègent les cellules des effets toxiques oxydatifs (Wassmann et coll, 2004 ; Sies and Jones, 2007). Dans des conditions physiopathologiques,

la balance prooxydants/antioxydants est déséquilibrée en faveur d'une hyperproduction de ROS. L' $O_2^{\bullet -}$ en se combinant avec le NO produit l'anion peroxynitrite ($ONOO^-$) ce dernier a des effets proathérogènes telque l'oxydation des LDL-cholestérol correspondant à l'un des évènements majeurs de l'athérosclérose (Griendling et coll, 2003)

Des études ont montré qu'une utilisation d'antioxydants améliore la réduction de la vasodilatation endothélium-dépendante chez des sujets hypertendus (Heitzer et coll, 2001). Chez des patients atteints d'insuffisance rénale chronique, il a été démontré qu'une augmentation des marqueurs de l'oxydation est corrélée avec une dysfonction endothéliale (Annuk et coll, 2001). L'augmentation de la production des ROS, chez des modèles d'animaux avec insuffisance rénale chronique conduit à une diminution de la biodisponibilité du NO et donc à un dysfonctionnement endothélial qui peut être corrigé par une prise d'antioxydants (Hasdan et coll, 2002 ; Vaziri et coll, 2002). D'autres travaux ont confirmé qu'une administration de la Vitamine C, chez des patients ayant une insuffisance rénale chronique, améliore la dysfonction endothéliale (Traverser et coll, 2003). Dans des modèles d'animaux diabétiques, il a été suggéré qu'une augmentation du SO peut également conduire à un dysfonctionnement endothélial (Zguira et coll, 2013).

4.2. Dysfonction endothéliale et hypertension artérielle (HTA)

Selon la définition de l'OMS, l'hypertension artérielle se définit par une pression artérielle systolique supérieure ou égale à 140 mmHg et/ou une pression artérielle diastolique supérieure ou égale à 90 mmHg. L'HTA demeure un problème majeur qui touche un nombre important de sujets dans le monde. Elle constitue le principal facteur de risque cardiovasculaire, et touche 10 à 15% des adultes. De plus, l'HTA est une pathologie liée au

vieillesse parce que plus de 50% des individus ayant plus de 60 ans sont hypertendus. L'HTA est associée à une augmentation de l'incidence de mortalité totale et par maladies cardiovasculaires comme l'accident vasculaire cérébral, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque et l'insuffisance rénale. Selon les modèles étudiés chez l'homme, la première démonstration de l'existence d'une dysfonction endothéliale a été réalisée chez des patients hypertendus, les relaxations induites par l'ACh dans l'artère brachiale sont diminuées par rapport à des sujets normotendus. (Diederich et coll, 1990 ; Linder et coll, 1990 ; Luscher et coll, 1992). La diminution de la réponse à l'ACh suggère un dysfonctionnement de la production ou de la sensibilité à l'EDRF (Bennett et Thurston, 1996). Le dysfonctionnement endothélial contribue à l'augmentation des résistances périphériques caractérisant l'hypertension artérielle. De plus, un dysfonctionnement endothélial a été mis en évidence au niveau des vaisseaux de résistance prélevés et soumis *in vitro* à l'ACh ou au flux chez des patients hypertendus (Taddei et coll, 1997 ; Ghiadoni et coll, 2000). La plupart des études réalisées chez l'homme suggère un rôle important de la diminution de la disponibilité en NO dans la dysfonction endothéliale liée à l'hypertension. D'autre part, chez l'animal, une dysfonction endothéliale a été constatée tant au niveau des vaisseaux de conductance que des vaisseaux de résistance dans des modèles d'animaux hypertendus (Lee et coll, 1995 ; Cordellini et coll 1999 ; Zhou et coll 1999 ; Zhou et coll, 2001 ; Sekiguchi et coll, 2002 ; Stankevicius et coll, 2002 ; Yang et coll 2004 ; Michel et coll 2008).

4.3. Dysfonction endothéliale et insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque est une maladie chronique avec une prévalence qui augmente avec l'âge. Le diagnostic clinique repose sur des symptômes et des signes qui témoignent d'un état

de congestion pulmonaire ou périphérique. L'augmentation des résistances artérielles systémiques est un indicateur d'insuffisance cardiaque congestive avancée. L'altération de la fonction vasodilatatrice de l'endothélium vasculaire a été démontrée dans l'insuffisance cardiaque que ce soit dans des modèles animaux ou chez l'homme. Il a été démontré chez des rats rendus insuffisants cardiaques par ligature des coronaires qu'un dysfonctionnement endothélial se développe au niveau de la circulation périphérique et pulmonaire et non au niveau de l'aorte (Varin et coll 1999). L'insuffisance cardiaque abolit la réponse dilatatrice dépendante du flux sans modifier la vasodilatation induite par l'ACh. Cela suggère que l'insuffisance cardiaque peut affecter sélectivement les facteurs endothéliaux vasodilatateurs et en particulier le NO (Vercauteren et coll, 2006). D'autres études ont montré que chez des patients insuffisants cardiaques, comme chez des animaux, il existe également une diminution de la vasodilatation dépendante du débit des artères périphériques et en particulier au niveau des artères de l'avant bras (Horning et coll, 1998 ; Joannides et coll, 2001). Dans certaines conditions pathologiques, y compris l'insuffisance cardiaque, on note une augmentation de production de facteurs vasoconstricteurs comme l'ET1. Une telle augmentation pourrait induire la baisse de production de NO qui participe à l'inhibition en permanence des effets vasoconstricteurs de l'ET1 et de sa production (Favre et coll, 2007). L'insuffisance cardiaque affecte de façon importante l'endothélium vasculaire, en particulier la production de monoxyde d'azote (NO). Les principales conséquences attendues de cette dysfonction sont :

- 1) au niveau coronaire : une altération de la perfusion et une augmentation des besoins métaboliques cardiaques, et
- 2) au niveau périphérique, une augmentation des résistances artérielles conduisant à une augmentation de la postcharge et du travail cardiaque. On peut

donc considérer qu'une telle dysfonction endothéliale participe à l'aggravation de l'insuffisance cardiaque, et constitue une cible pharmacologique majeure dans ce contexte. Cette dysfonction peut être réduite par des traitements "classiques" de l'insuffisance cardiaque (inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone), ainsi que des traitements plus récents (tels que l'ivabradine-bradycardisant en agissant sur courant pace maker If-). Enfin, de nouvelles approches ont été développées récemment dans l'optique de cibler spécifiquement l'endothélium et la production de NO, par exemple les inhibiteurs de tyrosine phosphatases 1B, dans le but de traiter secondairement l'insuffisance cardiaque via la protection endothéliale. (Vincent et coll, 2009 ; Marti et coll, 2012).

4.4. Dysfonction endothéliale et hypercholestérolémie

Plusieurs études suggèrent que les troubles lipidiques entraînent des anomalies de la vasomotricité. Chez l'homme, l'hypercholestérolémie est liée à une baisse de la vasodilatation endothélium dépendante à l'ACh même en présence d'un vaisseau morphologiquement normal. Ce dysfonctionnement est réversible et rétabli par une administration de la L-arginine ou de vitamine C (Best PJ et al, 1999). Les troubles lipidiques associés à une anomalie de la vasomotricité endothélium dépendante sont le résultat d'une présence de LDL-oxydées qui augmente la contractilité des cellules musculaires lisses (Robinson et coll, 2013). C'est la sécrétion d'ET1 par les cellules endothéliales qui inhibent la libération du NO via une activation des récepteurs scavenger et la vasodilatation endothélium dépendante (Brunner et coll, 2005). Chez le lapin hypercholestérolémique, l'augmentation rapide de la vasoperméabilité précède l'apparition de plaques d'athérosclérose (Wu et coll, 1995). Une augmentation de la fuite capillaire induite par les polynucléaires neutrophiles lors de

l'ischémie-reperfusion, chez des rats hypercholestérolémiques, montre le rôle de cofacteur des lipides dans la progression des lésions vasculaires (Harris et coll 1996). Les taux spécifiquement élevés de LDL circulant contribuent à l'installation de l'athérosclérose (Burnett et coll, 2008). Chez le lapin, il a été montré que l'hypercholestérolémie atténue l'angiogenèse (Van Bell et coll, 1997). Il existe une diminution de la synthèse et la libération du NO liée probablement d'une part à une inhibition de l'activation de la NOS en réponse aux stimuli humoraux et/ou hémodynamiques ; mais aussi une inactivation du NO par les LDL oxydées (Cromwell et coll, 2007). Cette diminution de la synthèse et de la libération du NO est probablement responsable de certaines conséquences comme la sensibilité aux facteurs vasoconstricteurs, la diminution de la résistance à l'adhésion et à l'agrégation plaquettaire et à la formation de thrombine (Emil et coll, 2012).

4.5. Dysfonction endothéliale et diabète

4.5.1. Généralités sur le diabète

Le corps humain est une « *machine* » complexe qui, pour son fonctionnement, a besoin d'énergie. Les cellules, qui sont la plus petite entité fonctionnelle du corps humain, ont besoin d'énergie pour assurer leur bon fonctionnement. En effet, la seule forme d'énergie principale utilisée par les cellules est l'ATP qui provient de la dégradation des aliments. Ces derniers apportent des molécules organiques qui, lors de leur dégradation, fournissent de l'énergie sous forme d'ATP. Les aliments apportent les glucides, les lipides et les protéines. Le glucose apporté par les aliments représente une source d'énergie importante pour l'organisme et il sera utilisé par les cellules puis le surplus va être stocké dans le foie et les muscles. En période postprandiale des concentrations trop élevées de glucose dans le sang entraîne la

libération d'une hormone unique hypoglycémiante, sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans situés dans le pancréas, pour faciliter sa pénétration et son stockage faisant ainsi baisser la concentration de glucose dans le sang. Cette hormone endocrine est l'insuline. Sa production est adaptée en permanence en fonction du taux de glucose dans le sang (la glycémie) dans le but de le garder globalement constant.

En période inter-prandiale, on note une baisse de la glycémie qui va stimuler le pancréas pour sécréter (par les cellules alpha) une autre hormone, ayant des effets opposés à ceux de l'insuline, le glucagon qui est une hormone hyperglycémiante. Cette hormone va permettre l'hydrolyse du glycogène en glucose pour le rediffuser dans le sang et donc son utilisation est toujours en relation avec toutes les cellules.

Selon l'origine de l'hyperglycémie on distingue 2 types de diabète, le diabète de type 1 ou insulino-dépendant et le diabète de type 2 ou non insulino-dépendant. Les deux types de diabète ont des causes variées et présentent des mécanismes différents, mais ils aboutissent au même résultat : des taux anormalement élevés de glucose dans le sang. Le diabète qui se veut une maladie chronique, se manifeste par une concentration trop élevée du glucose sanguin ($>1.26 \text{ g.l}^{-1}$ ou 6.9 mmol.l^{-1}) due à un dysfonctionnement du pancréas qualitatif ou quantitatif en insuline qui régule la glycémie. Le pancréas adapte en permanence sa production d'insuline au taux de glucose dans le sang dans le but de le garder globalement constant. Essentiellement, dans le cas d'une pathologie auto-immune, le diabète de type 1 (DT1) est le résultat d'un défaut de la sécrétion et/ou de l'action de l'unique hormone hypoglycémiante, l'insuline (Alberti and Zimmet, 1998 ; Grimaldi, 2009). Le DT1 est caractérisé par une hyperglycémie chronique avec des valeurs qui dépassent les valeurs seuils

établies par l'OMS. A jeun, lorsque la valeur est inférieure ou égale à 5.6 mmol/L (1.01 g/L) correspondant à une concentration en glucose dans le plasma de 6.1 mmol/L (1.10 g/L), la glycémie est dite « normale ». Le diabète est installé lorsque la concentration plasmatique en glucose déterminée, à jeun et par deux mesures successives, est supérieure ou égale à 7 mmol/L (1.26g/L). Lorsque 80 à 90% des cellules endocrines (cellules β des îlots de Langerhans du pancréas) productrices de l'insuline sont détruites, le diabète apparaît. La destruction des cellules productrices d'insuline est le résultat d'une attaque des cellules clés du système immunitaire de l'organisme (les lymphocytes T). On note également l'activation d'autres lymphocytes (lymphocytes B) qui produisent les auto-anticorps capables de se fixer sur les cellules β . Lors de la détection d'une hyperglycémie, à jeun, on détecte des marqueurs de destruction immune à savoir principalement quatre auto-anticorps (Verge et coll, 1996) :

Contre les cellules β (Islet Cell Antigen (ICA) et Islet Antigen 2 (IA-2))

Contre l'insuline (Insulin Auto Antibody (IAA))

Contre la décarboxylase de l'acide glutamique (Glutamic Acid Decarboxylase 65 (GAD65) impliquée dans les réactions immunitaires.

Le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant est le type de diabète le plus rencontré dans le monde avec 90% des cas de diabète, selon l'OMS. Les causes de la survenue de ce type de diabète est en relation directe soit avec une prédisposition génétique soit avec une surcharge pondérale et une sédentarité. Ce type de diabète correspond à une désensibilisation des récepteurs à l'insuline à l'action de cette hormone. Ceci va emmener à la diminution des réponses biologiques induites par l'insuline. C'est cet état qui est appelé résistance à l'insuline

et qui est lié au développement de ce type de diabète. Le diabète de type 2 touche généralement les individus adultes (+ 40 ans) mais de nos jours cette maladie commence à être dépistée chez les jeunes qui présentent une surcharge pondérale. Dans ce type de diabète il y a, le plus souvent, un état d'insulino-résistance. L'insuline synthétisée par le pancréas ne satisfait pas les besoins de l'organisme, on note une accumulation de glucose dans le sang ou une hyperglycémie.

4.5.2. Endothélium et diabète

Le diabète est associé à une augmentation de la mortalité (nombre de décès/effectifs population) liée à une morbidité (nombre de malade/effectifs population) cardiovasculaire. Les problèmes cardiovasculaires sont en relation direct avec les taux plasmatiques anormalement élevés de glucose. Mis à part cette hyperglycémie, d'autres facteurs de risques vasculaires jouent un rôle prédominant dont on cite par exemple : l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, les facteurs génétiques et l'hyperinsulinémie endogène (Mayaudon et coll. 2000 ; Halimi et coll. 2000). Rappelons que le tonus vasculaire est déterminé par un équilibre entre les effets opposés des substances vasodilatatrices ou vasoconstrictrices (Lüscher et coll. 1997 ; Goodfellow et coll. 1996). Chez le sujet diabétique, un dysfonctionnement endothélial est considéré comme un marqueur précoce de risque vasculaire (Sobrevia et coll. 1997).

De même que l'hypertension artérielle, l'insuffisance cardiaque, l'hypercholestérolémie et autres pathologies, le diabète révèle (via des modèles expérimentaux) une altération des réponses relaxantes endothélium-dépendante. Chez les rats rendus diabétiques par injection de STZ, on note une baisse de la vasodilatation endothélium dépendante à l'ACh au niveau de l'aorte thoracique (Zguira et al, 2013). Il a été bien établi que le diabète est associé à une dysfonction

endothéliale induit par l'altération de la relaxation endothélium dépendante (Bakker et coll, 2009 ; Teixeira-Lemos et coll, 2013). Chez des patients diabétiques de type 1 ou type 2, la réponse à l'ACh est réduite suggérant une dysfonction endothéliale (Gewaltig et coll, 2002 ; Delp et coll, 2008). Dans le modèle animal (diabète type 1) la relaxation endothélium dépendante induite par l'ACh est altérée à cause de la diminution de la biodisponibilité du NO (Olukman et coll, 2010).

4.6. Dysfonction endothéliale, surpoids et obésité

L'obésité est une maladie chronique, à potentiel évolutif conduisant à une pathologie d'organe et qui concerne plus d'un milliard de personnes dans le monde entier (Marie et coll, 2000 ; Gartner et coll, 1993). Selon la publication de l'OMS en mars 2013 (Kumari et Chandra, 2013), à l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. Le surpoids concerne 1,4 milliard de personnes de 20 ans et plus. Parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près 300 millions de femmes sont obèses (estimations de 2008). 35% des adultes âgés de 20 ans et plus étaient en surpoids et 11% étaient obèses (estimations de 2008). 65% de la population mondiale habitent dans des pays où le surpoids et l'obésité tuent plus de gens que l'insuffisance pondérale. Le surpoids concerne près de 40 millions d'enfants de moins de cinq ans (estimations de 2011). Plus alarmante encore est la mise en évidence récente d'anomalies de la fonction endothéliale chez les obèses démontrant que l'obésité est un véritable marqueur de risque de la survenue d'accidents cardiovasculaires (Miaadi-Messaoud et coll, 2010). Il a été démontré que la vasodilatation endothélium-dépendante induite par une injection iontophorétique d'ACh est significativement réduite chez des femmes obèses et des femmes en surpoids. Cette observation permet de suggérer l'incidence

de l'obésité et du surpoids sur le dysfonctionnement endothélial (Miaadi-Messaoud et coll, 2010). Parmi les origines possibles de cette dysfonction endothéliale, citons l'implication des adipocytes qui secrètent de nombreux facteurs de nature peptidique connus sous le terme d'adipokines (comme la leptine, la résistine etc ...). Casteilla et coll, (2004), ont montré que par ces sécrétions d'adipokines, le tissu adipeux participe à l'homéostasie énergétique de l'organisme et est aussi impliqué dans les fonctions cardiovasculaires. Le développement important du tissu adipeux, qui est associé à une réponse inflammatoire chronique caractérisée par une production élevée d'adipokines, influence de façon directe ou indirecte l'homéostasie vasculaire de sujets obèses (Correia et Haynes, 2004 ; Fève et coll, 2006).

4.7. Dysfonction endothéliale et vieillissement

Rappelons que la dysfonction endothéliale est définie comme les altérations fonctionnelles de la physiologie endothéliale caractérisée par une diminution de la synthèse ou de la biodisponibilité de substances vasodilatatrices (comme le NO) et par une augmentation de production des facteurs vasoconstricteurs (Beckman et coll., 1998). Ce déséquilibre provoque une vasoconstriction, une hyper-coagulation, une prolifération et un état pro-inflammatoire favorisant ainsi l'athérosclérose (Anderson TJ., 1999). Avec l'âge, un nombre important d'individus s'exposent à une multitude de facteurs de risques cardiovasculaires (comme l'hyperglycémie et l'insulino-résistance, l'obésité, le profil lipidique altéré et l'hypertension artérielle...). Ces facteurs de risques sont liés d'un côté à l'âge (le vieillissement) et d'un autre côté à la sédentarité. Des études ont montré que même des courtes périodes d'inactivité conduisent, chez des personnes âgées hospitalisées, à une insulino-résistance, un DE, une dyslipidémie et une augmentation de la pression sanguine (Stuart et coll., 1998 ; Smorawinski et

coll., 2000 ; thosar et coll., 2012). Toutefois, avec le vieillissement, les effets cumulatifs associés aux modifications métaboliques inévitables on note une baisse de la capacité de fonction réparatrice de l'endothélium. Les cellules endothéliales ne peuvent subir qu'un nombre limité de divisions et finissent par entrer dans un état de sénescence (connu comme un processus héréditaire endogène du vieillissement biologique) dans laquelle les cellules sont encore métaboliquement actives mais expriment un phénotype pro-inflammatoire, pro-oxydatif et pro-athérogène (Di Francescomarino et coll., 2009). Les effets cumulatifs de ces paramètres entraînent une forte baisse des capacités fonctionnelles de l'endothélium. Généralement, toutes les maladies cardiovasculaires ont une prévalence accrue chez les personnes âgées. D'autres études ont montré une absence de changements dans la vasodilatation endothélium-indépendante chez l'homme et l'animal âgés, preuve qui laisse suggérer que les changements sont liés à la vasodilatation endothélium-dépendante et en grande partie à la libération du NO (Cosentino et coll., 2007). Cependant, il y a aussi quelques changements dans la synthèse et la libération d'autres facteurs vasodilatateurs comme l'EDHF et la PGI₂ et une augmentation des facteurs vasoconstricteurs (Vanhoutte, 2004). Lakatta, (2003) et Brandes et coll (2005) ont montré également la présence de changements structuraux dans l'endothélium liés au vieillissement comme l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, la perméabilité et la diminution de la régénération et des capacités angiogéniques. Ainsi, de nombreux mécanismes peuvent expliquer l'altération de la fonction endothéliale liée au vieillissement. Cependant, le stress oxydatif et l'inflammation interviennent dans ce processus.

4.8. Dysfonction endothéliale et inflammation

L'inflammation joue un rôle important dans la pathogenèse de plusieurs maladies cardiovasculaires. L'athérosclérose, par exemple, est une maladie inflammatoire médiée par les macrophages dérivés des monocytes qui s'accumulent dans les plaques artérielles et libèrent des cytokines pro-inflammatoires qui causent des dommages tissulaires (Leung et coll., 2008). L'augmentation des protéines C-réactives (CRP), qui est un des marqueurs de l'inflammation, est considérée comme un facteur prédictif d'évènements cardiovasculaires (Balducci et coll., 2010). De plus, la CRP et d'autres cytokines inflammatoires provoquent le déclenchement d'un dysfonctionnement vasculaire (Sprague et Khalil, 2009), en modifiant l'activité et l'expression du canal calcique (Tiwari et coll., 2007), en régulant à la hausse l'expression et la fonction de la Rho-kinase (Hiroki et coll., 2004) et en augmentant la production des ROS (Zhang et coll., 2008). Cette augmentation est induite par la cyclo-oxygénase (COX) et par l'expression de médiateurs pro-inflammatoires, comme l'interleukine 1B (IL1B), IL-6, « Tumor Necrosis Factor » TNF- α , de la COX-2 et la iNOS (Kim et coll., 2002). Une étude a relevé, pour la première fois, une surexpression d'une cytokine pro-inflammatoire, la TNF- α , dans le tissu adipeux chez la souris obèse confirmant l'association entre l'inflammation et l'obésité (Hotamisligil et coll., 1993). D'autres études ont montré l'implication de l'inflammation dans le processus de la dysfonction endothéliale lorsque certains facteurs de risques cardiovasculaires, tels le diabète, l'obésité, et l'hypertension artérielle, sont présents (Ross, 1999 ; Libby, 2006).

5- Vasomotricité endothélium dépendante et activité physique

5.1. Mécanismes des effets de l'activité physique sur l'endothélium et la vasomotricité

De nombreuses études ont été réalisées chez les animaux concernant les effets de l'exercice physique sur la vasomotricité endothélium-dépendante via le NO/EDRF. Ainsi, un entraînement de l'ordre de 4 semaines chez le rat augmente la biosynthèse du NO endothélial dans les artérioles de muscles squelettiques. Par ailleurs, alors que les réponses vasodilatatrices induites par l'ACh et par la L-arginine sont augmentées, les réponses induites par le Nitroprussiate de sodium demeurent constante. Ceci veut dire qu'il y a une amélioration de la fonction vasorelaxante endothélium-dépendante mais aucune modification de la sensibilité du MLV au NO (Sun et coll, 1994). Une autre étude réalisée par Koller et coll, (1995) a montré que chez un rat traité au LNMMA (inhibiteur de la NOS), l'entraînement physique permet d'augmenter la vasodilatation des artérioles du muscle squelettique. Il peut donc en être déduit, que l'augmentation de la production endothéliale du NO/EDRF est induite par l'exercice qui est une réponse adaptative à celui-ci.

Concernant les vaisseaux sanguins de diamètre plus important, il a été observé qu'un entraînement aérobie d'1h/jour chez le porc améliorerait la vasodilatation endothélium dépendante (McAllister et Laughlin 1997). De même chez le rat, Delp et coll, (1993) ainsi que Delp et Laughlin, (1997), ont observé qu'un entraînement de 4 semaines était capable

d'augmenter la vasodilatation induite par l'ACh au niveau de l'aorte abdominale isolée tout en augmentant la concentration intracellulaire de la NOS endothéliale de la paroi aortique. En outre, il a été démontré que lorsque les forces de cisaillement sont faibles dans certains vaisseaux chez des animaux ayant effectué un entraînement physique, aucune amélioration de la vasodilatation endothélium dépendante n'est observée. Par ailleurs, 8 semaines d'entraînement physique chez le lapin, sur tapis roulant vont entraîner une augmentation de la vasodilatation endothélium dépendante à l'ACh au niveau de l'aorte thoracique et des artères pulmonaires mais pas au niveau de l'artère carotide (Chen et Li, 1993). De même, 4 semaines d'activités physiques journalières chez le rat vont améliorer la vasodilatation endothélium dépendante au niveau des artérioles du muscle lisse squelettique. En revanche, aucune modification n'est observée au niveau des artères mésentériques (Sun et coll, 1998). De ce fait, ceci s'explique par l'exercice physique qui n'induit pas de forte augmentation du flux sanguin tant au niveau de l'artère carotide qu'au niveau des vaisseaux mésentériques. Et par voie de conséquence, il n'induit pas d'augmentation du shear stress (Sun et coll, 1998).

Au niveau des vaisseaux coronaires, il a été prouvé que l'entraînement physique augmente l'apport de sang dans le lit coronarien chez le porc (Laughlin et coll, 1999). Il a été montré plus tard chez le chien (entraîné 1h/jour, pendant 10 jours sur tapis roulant), que cette augmentation était liée à une vasodilatation endothélium dépendante (Wang et coll, 1993). Par ailleurs, il a été observé, que l'activité physique fait augmenter l'expression du gène de la NOS dans les artères coronaires chez le chien entraîné pendant 10 jours (Sessa et coll, 1994). Une autre étude chez le porc a montré qu'un entraînement physique de 16 semaines augmente la quantité d'ARNm codant pour la NOS (Woodman et coll, 1997). Ceci suggère que

l'augmentation de NO et la vasodilatation endothélium dépendante peuvent persister long temps dans les vaisseaux étudiés. Les mêmes résultats ont été observés chez le rat, à savoir que l'activité physique et donc les forces de cisaillement induisent une surexpression de la NOSe. Et en conséquence, on note une augmentation de la vasodilatation endothélium dépendante (Woodman et coll, 2005). Il est à signaler que l'exercice physique agit sur l'ensemble de la paroi artérielle. Ainsi, pour ce qui concerne les vaisseaux coronaires, les vaisseaux des muscles squelettiques, l'aorte, l'artère pulmonaire etc... Il est de plus à noter que les terminaisons nerveuses péri-vasculaires parasympathiques, si elles sont présentes, sont stimulées ; les cellules MVL qui deviennent moins sensibles à la noradrénaline, à l'adrénaline et à l'ET1, ont leurs canaux calciques inhibés et deviennent plus sensibles à l'adénosine. Enfin, l'endothélium vasculaire tout en étant le siège d'une surproduction de NO (via la NOSe) est aussi le siège d'une suractivité de la SOD alors que la production endothéliale de molécules vasoconstrictrices telles que le TxA2 et l'ET1 est diminuée.

5.2. Effets de l'activité physique sur les dysfonctionnements endothéliaux associés à différentes pathologies et facteurs de risques cardiovasculaires

Parmi les facteurs de risques cardiovasculaires le plus souvent associés à un dysfonctionnement endothélial citons l'HTA, le diabète (de type 1 et 2), l'hypercholestérolémie, le tabagisme, l'obésité, le surpoids, le vieillissement et la sédentarité (Endemann et Shiffrin 2004). Rappelons que ces dysfonctionnements endothéliaux correspondent le plus souvent à une adaptation ou peuvent conduire à une potentialisation du risque pathologique. Nous exposerons successivement les effets de l'activité physique sur

l'endothélium dans quelques pathologies cardiovasculaires (HTA, IC, hypercholestérolémie) dans le diabète et le syndrome métabolique ainsi que dans d'autres facteurs de risques.

5.2.1. Activités physiques et pathologies cardiovasculaires

Les différentes études réalisées depuis de nombreuses années montrent que la pratique régulière d'une activité physique modérée est importante pour assurer la prévention primaire et secondaire de ces maladies cardiovasculaires (Casillas et coll., 2007 ; Grasser et coll., 2007 ; Werburton et coll., 2007 ; Blair et coll., 2006). En effet, l'activité physique a des effets préventifs et thérapeutiques tels qu'elle peut être associée (ou même substituée) à certaines prescriptions médicamenteuses (antihypertenseurs, inhibiteur du système rénine-angiotensine-aldostérone, inhibiteurs des récepteurs à l'angiotensine 2, les statines ...). Ainsi, commence à se développer le principe de la prescription d'une activité physique en association avec un traitement médicamenteux pour ce qui concerne les maladies cardiovasculaires. Par exemple, chez l'hypertendu une activité physique associée à un traitement antihypertenseur peut amener à diminuer la posologie des médicaments prescrits ce qui est bénéfique à tous points de vue. Par ailleurs, il est démontré également que l'entraînement physique (3h/semaine) ralentit l'évolution des maladies cardiovasculaires en réduisant les effets des facteurs de risques propres à ces pathologies (amélioration du profil lipidique et de la répartition de la masse grasse, diminution de l'insulino-résistance et de la pression artérielle systolique). Même si les mécanismes inducteurs des bénéfices de l'exercice physique sur les pathologies cardiovasculaires ne sont pas totalement élucidés, un grand nombre de travaux expérimentaux arrive à un consensus : l'activité physique stimule la fonction endothéliale régulatrice de la

vasomotricité et, même, prévient l'apparition d'un dysfonctionnement endothélial voir permet la restauration de fonctions endothéliales dégradées.

Si les effets de l'activité physique sur la relaxation endothélium dépendante au NO de sujets sains sont très controversés (Tanriverdi et coll., 2005 ; Hannukainen et coll., 2007), de nombreux travaux indiquent que l'activité physique permet de prévenir et de diminuer la dysfonction endothéliale. Par ailleurs, l'activité physique préserve la fonction endothéliale dépendante du NO chez des sujets à risques cardiovasculaires mais permet aussi de rétablir une fonction endothéliale altérée dans les territoires vasculaires sollicités ou non par l'exercice physique. Nous citerons quelques exemples tant expérimentaux que cliniques relatifs aux effets de l'exercice sur l'endothélium :

Chez la souris hypercholestérolémique (génétiquement dépourvue d'apolipoprotéine E), 4 semaines de course sur tapis ou 9 semaines de nage (Pellegrin et coll., 2007) préviennent la diminution de la vasodilatation endothélium dépendante au niveau de l'aorte tel qu'elle est observée chez les souris hypercholestérolémique sédentaires vs les souris normales cholestérolémiques (Neibauer et coll., 1999). Ces résultats ont été observés sur d'autres modèles tant au niveau des artères de conductance qu'au niveau des artères de résistance (Raham et coll., 2004 ; Chakraphan et coll., 2005). Ces observations ont également été confirmées chez l'homme (Watts et coll., 2004).

Chez les patients coronariens l'effet bénéfique de l'activité physique sur la dysfonction endothéliale est observé au niveau des artères résistantes de l'avant-bras et au niveau des artères coronaires. Ainsi, la vasoconstriction coronarienne paradoxale induite par l'ACh chez

le coronarien est diminuée de l'ordre de 54% lorsqu'il y a eu un entraînement physique de 4 semaines (Desouza et coll., 2000 ; Hambrecht et coll., 2000).

Pour ce qui concerne l'HTA, il a été observé que l'activité physique (course sur tapis roulant pendant 3 mois) améliore la production de NO/EDRF (et aussi d'EDHF) chez des rats hypertendus (Yen et coll., 1995 ; Chen et coll., 1999).

Chez l'hypertendu la pratique de l'activité physique présente peu de risques (musculosquelettique et cardiovasculaire) pourvu que des tests d'effort préalables ont été fait et aussi que l'activité physique soit régulière. En effet, les risques sont très faibles lorsque les patients suivent scrupuleusement et donc régulièrement leurs entraînements adaptés (Sherman DL et coll., 2002). Par contre beaucoup de bénéfices découlent de cette activité physique régulière. Ainsi au niveau de la pression artérielle il y a une baisse de l'ordre de 6 - 10 mmHg en pression systolique et de l'ordre de 4 – 8 mmHg en pression diastolique (Higashi et coll, 2004) Ces bénéfices concernent aussi bien la prévention de la maladie hypertensive que le traitement d'une hypertension avérée. Le niveau d'effort nécessaire n'est pas obligatoirement important. Ainsi, le simple fait de marcher fréquemment peut induire un effet protecteur (Hayashi et coll., 1999).

Nous avons indiqué précédemment, que l'activité physique diminue le niveau de pression artérielle d'un individu hypertendu pour des valeurs de 6-10mmHg en systolique et de 4-8mmHg en diastolique. Cette baisse de la pression systolique va entraîner une réduction de 6% de la mortalité par accident vasculaire cérébrale et de 4% de la mortalité par coronaropathie (Cornelissen et Fagard 2005). Rappelons qu'une activité physique associée à

un traitement médicamenteux antihypertenseur est une démarche thérapeutique maintenant acceptée. Il est cependant essentiel que le patient respecte les modalités d'entraînement prescrites afin d'obtenir des résultats satisfaisants. Enfin, signalons que l'effet hypotenseur de l'activité physique se manifeste à partir d'un niveau d'activité modérée et semble indépendant de l'intensité de l'effort à condition de rester à un niveau sous-maximal. Par ailleurs, une activité physique trop faible n'aura aucune efficacité.

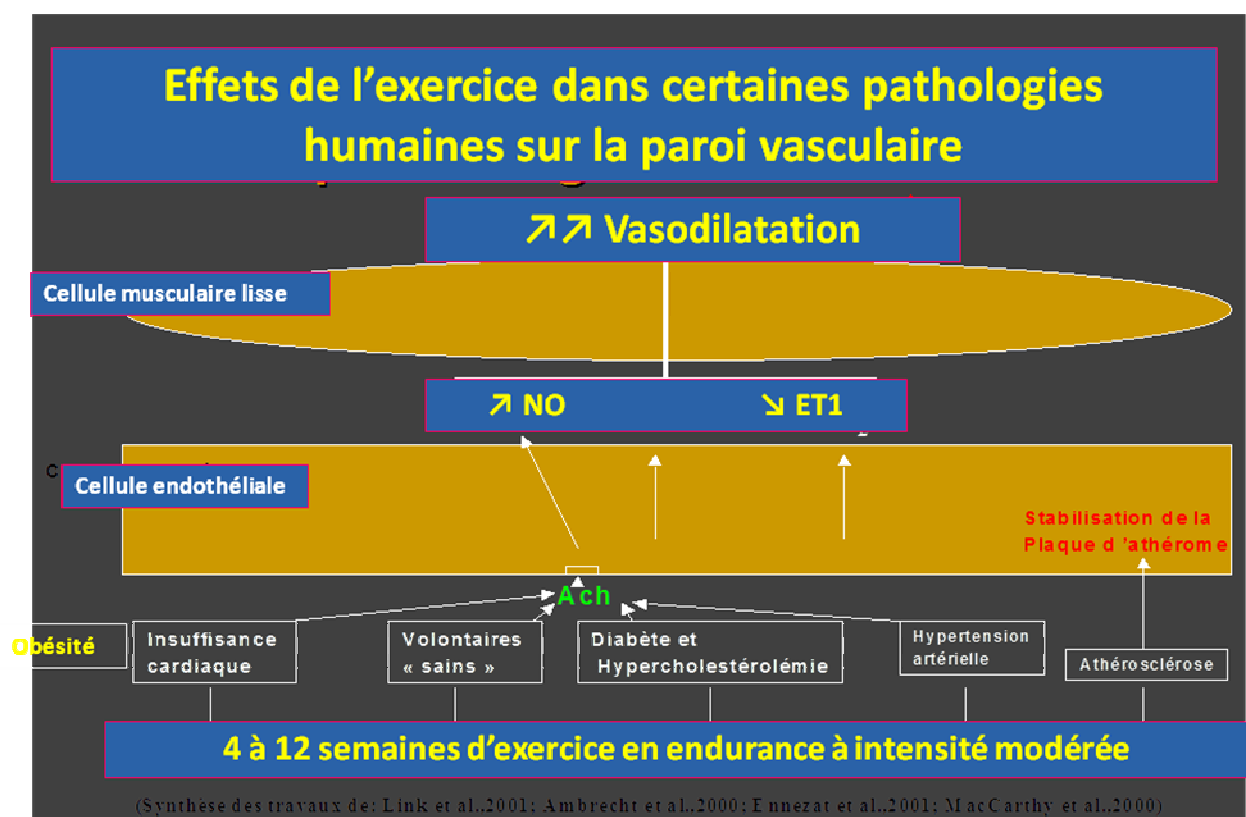


Figure 13. Effets de l'exercice dans certaines pathologies sur la paroi vasculaire (Saïag et Al, 2003)

On note une augmentation de la biosynthèse du NO et une baisse de l'endothéline 1 après une période 4 à 12 semaines d'entraînement en endurance à une intensité modérée chez des sujets humains. Le NO traverse la membrane du MLV et via la voie des GMPc provoque une amélioration de la vasodilatation.

5.2.2. Activités physiques et diabète

Il est bien admis que la pratique d'une activité physique régulière accompagnée d'une alimentation saine est une pratique incontournable de prévention, de prise en charge et de traitement des facteurs de risques cardiovasculaires. L'exercice chronique aérobie améliore la fonction cardiovasculaire chez l'homme. Cela est vrai non seulement chez les sujets en bonne santé (sans facteurs de risques) (Clarkson et coll., 1999), mais aussi chez les personnes âgées et ceux qui présentent des facteurs de risques cardiovasculaires (Hambrecht et coll., 1998). En effet, l'activité physique sera plus bénéfique chez ceux qui ont des facteurs de risques ou des maladies cardiovasculaires. Par exemple, une période de 8 semaines d'activité physique améliore d'une manière significative la fonction endothéliale, chez des patients diabétiques (type2) (Maiorana et coll., 2001a) mais pas chez des sujets sains (Maiorana et coll., 2001b). Une étude américaine réalisée par le « Diabetes Prevention Program Research Group » sur la prévalence du diabète de type 2, montre qu'une modification des habitudes journalières et de mode de vie était plus bénéfique que la prise de traitement pharmacologique. Dans cette étude 3234 sujets avec un IMC > 24 non atteints de diabète (type 2) mais qui sont en état de pré-diabète avec une intolérance au glucose ont été randomisés en 3 groupes. Le 1^{er} groupe : changement des habitudes de vie, le 2^{ème} groupe : prise de traitement pharmacologique hypoglycémiant et le 3^{ème} groupe placebo. Le premier groupe suivait un régime hypocalorique et hypolipémiant accompagné d'une activité physique modérée comme la marche rapide à la hauteur de 150 min/semaine dans le but de diminuer leur poids initial de 7%. La période d'étude s'étendait sur 2,8 ans en moyenne, l'incidence du

diabète de type 2 a diminué de 58% dans le 1^{er} groupe et de 31% dans le 2^{ème} comparés au groupe placebo (Knowler et coll., 2001). D'autres études confirment ces auteurs en ces résultats (Hamdy et coll., 2003). De ce fait, la communauté médicale conseille aux patients diabétiques de pratiquer une activité physique modérée (40 à 60% de la $\dot{V}O_{2max}$) durant 20 à 30 min (au minimum) 3 à 5 fois par semaine. Chez les rats diabétiques de type 2, l'exercice physique va également réduire la baisse de NO/EDRF et d'EDHF (Minami et coll., 2002). Chez les adultes, les anomalies de la fonction vasculaire sont détectables généralement avant le développement de la pathologie (Juonala et coll, 2008). Par ailleurs, les enfants et les jeunes adultes atteints d'hyperlipidémie familiale et ayant des antécédents de diabète de type 2 sont connus pour être à risque important vis-à-vis du développement de pathologies vasculaires.

5.2.3. Activités physiques, surpoids et obésité

Etant donné que la sédentarité est un facteur causal de l'obésité, la pratique d'une activité physique régulière est considérée bénéfique pour la santé et particulièrement contre l'obésité. De nombreux travaux ont recommandé la pratique d'activités physiques dans le but de lutter contre l'obésité (Bandeau et coll, 2003 ; Lazzer et col, 2004). Plus alarmante encore est la mise en évidence récente d'anomalies de la fonction endothéliale chez les obèses démontrant que l'obésité est un véritable marqueur de risque de la survenue d'accidents cardiovasculaires. De plus, l'excès de la masse grasse est associé à une élévation modérée des taux circulants de médiateurs inflammatoires non spécifiques d'interleukines et de cytokines (C-Réactive Protéine, cytokines, interleukines, molécules d'adhésion ou de remodelage de la matrice extracellulaire), produits par le foie et les organes lymphoïdes mais également par le tissu

adipeux blanc. Il s'agit de protéines de la phase aiguë de l'inflammation (Poitou et coll, 2007). Comme les autres tissus de l'organisme, le tissu adipeux possède des macrophages « résidents » dont la fonction n'est pas clairement établie, mais qui semblent avoir une action anti-inflammatoire (phénotype M2, produisant des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10). La réduction pondérale, permet une amélioration de l'état inflammatoire observé dans l'obésité et une chute de l'expression des gènes de l'inflammation du tissu adipeux (Kong et coll, 2013). En fait, de nombreuses études ont prescrit la pratique d'une activité physique dans les programmes de lutte et de prévention contre cette pathologie (Lazzer et coll, 2004 ; Ben Ounis et coll, 2010). De même, il a été démontré qu'une meilleure utilisation périphérique du glucose pourrait prévenir l'obésité, ce qui plaide en faveur du rôle primordial d'une activité physique régulière. L'entraînement combiné avec un programme de régime hypocalorique a amélioré la capacité à oxyder les lipides pendant l'exercice, et cette amélioration a été associée aux améliorations des concentrations plasmatiques des adipocytokines chez des adolescentes obèses. De nombreux travaux ont décrit les déficiences de la fonction endothéliale jusqu'à 50% chez les enfants et l'adolescent obèse comparés à des sujets normaux (Aggoun et coll, 2008 ; Fernhall et coll, 2008).

5.2.4. Modalités de l'activité physique et effets sur la vasodilatation endothélium dépendante

Le type d'exercice le plus adapté pour stimuler la fonction endothéliale est l'entraînement en endurance (Desouza et coll., 2000). Par ailleurs, l'entraînement en résistance lorsqu'il n'est pas trop intense permet aussi de stimuler la vasodilatation endothélium dépendante (Hambercht et coll., 2000). Par contre, peu d'études ont été réalisées concernant les effets de

la durée, de la fréquence et de l'intensité sur l'amélioration de la fonction endothéliale régulatrice de la vasomotricité. Pour ce qui concerne la durée, il semble qu'un entraînement de 6 semaines permet d'avoir des relaxations endothélium dépendantes optimales (Haram et coll., 2006). Par contre, chez l'animal, des durées d'entraînement de plusieurs mois ne provoqueraient plus de modifications de la fonction endothéliale mais provoqueraient une augmentation du diamètre de la lumière des artères ce qui aurait pour conséquence de réduire les forces de cisaillement et donc de normaliser la vasodilatation endothélium dépendante. Pour ce qui concerne la fréquence des séances des entraînements et donc leurs capacités à stimuler la fonction endothéliale, peu de travaux ont été réalisés. Citons ceux de Heylen et coll., (2008) qui consistent à étudier la vasodilatation endothélium dépendante chez le rat sain pendant 8 semaines, sur tapis roulant avec des fréquences de 1, 3 ou 5 séances par semaine. Ces auteurs observent que la potentialisation de la vasomotricité endothélium dépendante croît avec le nombre de séances par semaine. Il serait intéressant que cet effet soit confirmé chez l'homme. Pour ce qui concerne l'intensité de l'exercice, il est constaté qu'un exercice à intensité modérée est efficace pour augmenter la vasodilatation endothélium dépendante. Par contre, lorsque l'intensité de l'entraînement est trop forte les effets sur la vasodilatation endothélium dépendante diminuent (Goto et coll., 2003). Il ressort de ces données qu'une activité physique chronique en endurance ou en résistance d'intensité modérée est la condition nécessaire pour améliorer la relaxation endothélium dépendante.

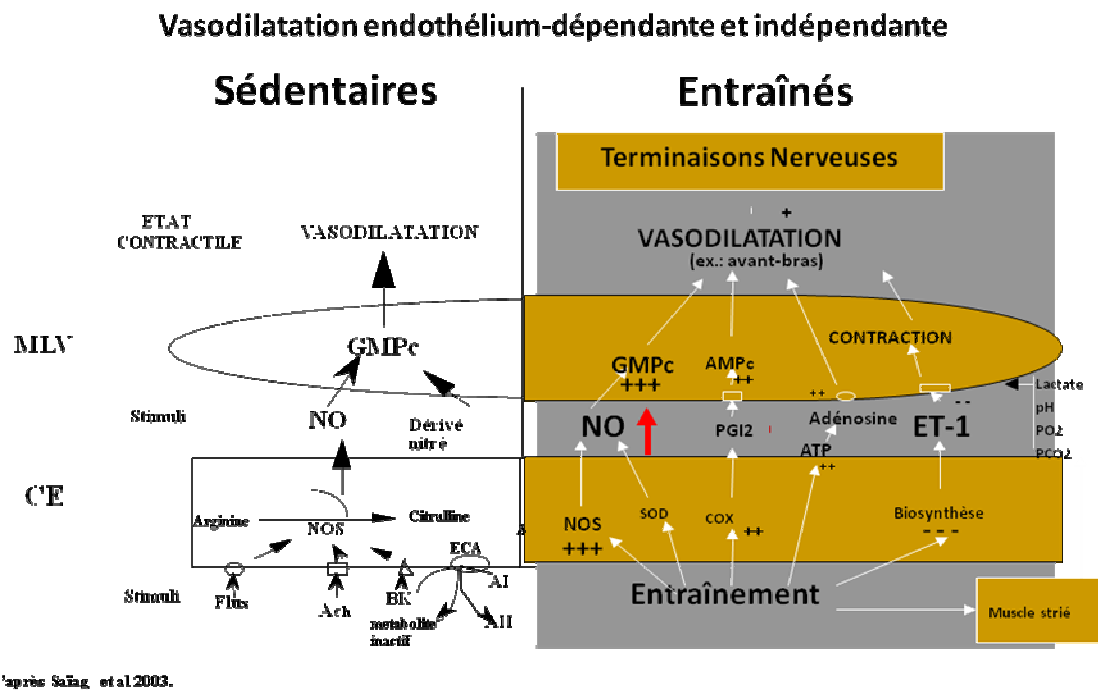


Figure 14. Comparaison entre sportifs et sédentaires

On note une augmentation de la biosynthèse du NO via une augmentation de l'activité de la NOS induite par l'entraînement. Le NO traverse la membrane du MLV et via la voie des GMPc provoque une vasodilatation.

Nous présentons ci-dessous une synthèse bibliographique sur les Effets de l'exercice en fonction de l'intensité et de la durée chez des sujets pathologiques.

Tableau 1 : patients insuffisants cardiaques chroniques

Références	Sujets et méthodes	Entraînement	Réponse à l'entraînement	Commentaires	VED	VEI
Mairona et al, 2000	12 hommes (60 ans). Dans l'avant-bras pléthysmographie à jauge de contrainte HRPO 10 min.	3 x 1 h/semaine d'exercice aérobic (70 – 80 % de la FCmax) et de résistance (55 – 65 % contraction max) combinés pendant 8 semaines	↗ de la VO2max de 14%, ↗ de la durée de l'exercice test de 27%, ↗ de la force musculaire de 15%	Il y a une augmentation de l'ACH et SNP avec la pratique de l'exercice physique	↗	↗
Linke et al, 2001	22 hommes (≤ 70 ans) (la fraction d'éjection < 40%) Ultrason des l'artère radiale HRPO 5 min	Ergocycle 6x10 min/jour à 70% de la VO2max pendant 4 semaines	↗ 21% de la VO2max	L'exercice physique des membres inférieurs ↗ les réponses à l'ACH et HRPO dans l'avant-bras	↗	↔
Kobayashi et al, 2003	2 hommes et 2 femmes (55 ans) (la fraction d'éjection < 40%) Ultrason des artères brachiale et tibiale postérieure. HRPO 5 min	2 sessions de 15 min /jour, 60-70% VO2max, 2-3 jours/semaine pendant 3 mois sur ergocycle	↗ de la distance de course parcourue	Augmentation significative HRPO dans l'artère tibiale et non significative dans l'artère brachiale après l'entraînement physique	↗ artère brachiale	↔
Selig et al, 2004	33 hommes et 6 femmes (65 ans) (la fraction d'éjection < 40%) Dans l'avant-bras pléthysmo à jauge de contrainte HRPO 5 min	Entraînement de résistance à intensité modérée (ergocycle). 3x/semaine pendant 3 mois	↗ 11% de la VO2max, ↗ 21% de la force musculaire ↗ 21% de l'endurance	↗ HRPO avec l'entraînement physique	↗	↔
Parnell et al, 2005	21 hommes (18-70 ans) (la fraction d'éjection < 40%). Dans l'avant-bras pléthysmographie à jauge de contrainte HRPO 10 min	Exercice aérobic 50-60 % FCmax 3x/semaine, pendant 8 semaines	↗ De la capacité d'exercice dans le groupe entraîné	↗ ACH, SNP et transport de la L-arginine avec l'exercice physique	↗	↗
Wissloff et al, 2007	20 hommes et 7 femmes (75 ans) (la fraction d'éjection < 40%) ultrason de l'artère brachiale HRPO 5min	Entraînement aérobic intermittent modéré continu à 70% de la FCmax, 3x/semaine pendant 12 semaines sur tapis roulant	↗ 46 % de la VO2max pour entraînement aérobic intermittent ↗ 14% de la VO2max pour entraînement continu	↗ HRPO avec l'entraînement physique pas d'effet de la nitro-glycérine	↗ ↗	↗

Tableau 2 : patient athéromateux chroniques

Les patients athéromateux chroniques						
Hambrech et al, 2000	19 patients masculins. Angiopathie des coronaires. Doppler Ultrason des vaisseaux coronaires épi cardiales	Ergocycle 6x10min/jour à 80% de la FCmax pendant 4 semaines	↗ 12% de la VO2max	↗ De la réponse à l'ACh avec l'exercice	↗	↔
Gokce et al, 2002	58 patients masculins (59 ans) Ultrason de l'artère brachiale et tibiale HRPO 5 min	30-40 min 3x/semaine de réhabilitation cardiaque (tapis ou ergocycle à 45-85% FCmax) pendant 10 semaines	↗ 29% de la capacité fonctionnelle	↗ Signif HRPO dans l'artère tibiale et ↗ Non signif de l'artère brachiale	↗ Artère tibiale	↔
Gielen et al, 2003	19 patients masculins. Angiopathie des coronaires. Doppler Ultrason des vaisseaux coronaires épi cardiales	4 semaines d'entraînement à l'hôpital (60 min/jour à 80% de FCmax d'ergocycle) suivi de 5 mois d'entraînement à domicile (20min/jour à 80% de FCmax) d'ergocycle	↗ 8% de VO2max ↗28% de la capacité physique de travail	↗ De la réponse à l'ACh avec l'exercice. L'entraînement à domicile soutient les effets bénéfiques obtenus à la fin de l'hospitalisation	↗	↔
Walsh et al, 2003	10 patients masculins (55 ans) et 10 sujets sains (54 ans) Ultrason de l'artère brachiale HRPO 10 min	Combinaison d'exercice de résistances et aérobies (ergocycle et tapis) à 70% de la FCmax, 3x/semaine, pendant 8 semaines	↗ 9% de la durée du test d'effort sur ergocycle	↗ HRPO suite à 8 semaines d'exercice. L'effet VED semble généralisé	↗	↔
Hambrech et al,	35 patients masculins (65 ans) Angiopathie des coronaires. Doppler Ultrason des vaisseaux coronaires épi cardiales	3x10 min de rameur et 3x10 min d'ergocycle/jour pendant 4 semaines		↗ De la réponse à l'ACh de 56%	↗	
Edwards et al, 2004	18 patients masculins (58-63 ans) Ultrason de l'artère brachiale HRPO 1 min. Dosage de nitric/nitrate. Dosage de la superoxyde dismutase	Ergomètre (tapis ou cycle) 3x30min/semaine à 65% de FCmax pendant 12 semaines. L'intensité et la durée ↗progressivement		↗41.7% de la réponse à HRPO ↗22% des nitrates et nitrites dans le plasma ↗12% de la SOD	↗	

Tableau 3 : patients diabétiques

Références	Sujets et méthodes	Entraînement	Réponse à l'entraînement	Commentaires	VED	VEI
Maiorana et al, 2003	14 hommes et 2 femmes de 52 ans diabétiques type 2. Dans l'avant bras, pléthysmog à jauge de contrainte. Ultrason de l'artère radiale	3x1h d'exercice aérobie ((à 70-85% de FCmax) et résistance (55-65% de CMV)/semaine pendant 8 semaines	↗ 7% de la VO2max	↗ ACh et HRPO. Pas de changement au SNP et à la nitroglycérine	↗	↔
Miche et al, 2006	16 hommes et 4 femmes (67 ans)	Combinaison d'exercices de résistances (2x/semaine) et aérobies (3x/semaines) sur ergocycle à 60-80% de la VO2max pdt 4 semaines	↗ de la VO2max	Pas de changement avec HRPO et la nitroglycérine après entraînement	↔	↔
Cohen et al, 2008	28 hommes et femmes de 40-80 ans avec un diabète de type 2. Dans l'avant bras. Laser doppler	45 min d'entraînement de résistance à 75 et 80% de 1-RM, 3 séries de 8 répétitions. 2x/semaine pdt 2 mois. Puis 1 prog d'entR supervisé (centre) et non supervisé (maison) pdt 12 mois		↗ ACh et SNP après 14 mois d'entraînement	↗	

Légende aux tableaux 1, 2 et 3 : VED : vasodilatation endothélium-dépendante, VEI : vasodilatation endothélium-indépendante, LD : laser doppler Débitmètre, ACh : acétylcholine, SNP : nitroprussiate de sodium, HRPO : hyperémie réactionnelle post occlusive, L-NMMA : N-Nitro-L-arginine methyl ester

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

ARTICLE 1



PREMIERE ETUDE :

Article 1

EFFETS DE L'EXERCICE PHYSIQUE INTENSE SUR LA VASODILATATION ENDOTHELIUM-DEPENDANTE CHEZ DES RATS DIABETIQUES DE TYPE 1

Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta

Mohamed Sami Zguira, Sophie Vincent, Solène Le Douairon Lahaye, Ludivine Malarde,
Zouhair Tabka and Bernard Saiag

Publiée dans *Cardiovascular Diabetology* (IF : **4.21**)

- But de l'étude

Les connaissances relatives aux effets de l'exercice sur la paroi vasculaire et particulièrement l'endothélium, pour les sujets sains, sont maintenant de plus en plus connues pour ce qui concerne la relaxation endothélium-dépendante à l'acétylcholine (ACh) et dans une moindre mesure aux purines. Par contre, peu d'informations sont acquises quant à l'impact d'un

exercice intense sur la relaxation endothélium-dépendante lorsqu'un syndrome métabolique (Diabète) est installé. De ce fait, l'objectif de cette approche expérimentale est de déterminer les effets d'un entraînement physique en endurance et d'intensité élevée sur la relaxation endothélium-dépendante (EDR) induite par l'ACh et un ADP stable l'adenosine-5- O – (2-thiodiphosphate) (ADPβS) chez des rats rendus diabétiques type 1.

- Matériels et méthodes

On a utilisé pour cette étude 44 rats wistar mâles âgés de 9 semaines, répartis de façon aléatoire en 4 groupes de rats, contrôles sédentaires (SC, n = 10), contrôle entraînés (TC, n = 10), diabétiques sédentaires (SD, n = 14) et diabétiques entraînés (TD, n = 10). Après une période d'adaptation et une confirmation du rendu diabétique des rats suite à une injection intrapéritonéale d'une dose unique de streptozotocine (STZ) (45mg/kg), un programme d'entraînement est suivi pendant 8 semaines. Le programme consiste à faire courir les rats progressivement sur un tapis roulant (inclinaison de 10°) à une fréquence de 5 jours par semaine, 1heure par jour à une vitesse finale de 25 m/min. Au terme de la période d'entraînement, 24 à 48h après la dernière session d'entraînement, les rats sont anesthésiés puis sacrifiés et l'aorte thoracique est prélevée délicatement. Des anneaux d'aortes de 5 mm sont préparés et maintenus dans des conditions physiologiques adéquates (dans une solution de Krebs maintenue à 37°C et oxygénée à 95% O₂ et 5% CO₂). Les anneaux d'aorte sont, par la suite, montés horizontalement dans des bains remplis de 15 ml de la solution de Krebs et laissés pendant 1 heure pour revenir à l'état basal. Les anneaux d'aortes sont prétendus à 600

– 900 mg. Un test de l'intégrité fonctionnelle de l'anneau d'aorte est effectué par une contraction au KCl au début de chaque expérience. Une série de drogues sont injectées pour vérifier les différents paramètres étudiés. Un système d'acquisition de données enregistre les résultats obtenus.

- Analyse statistique

Les valeurs sont exprimées par la moyenne \pm SEM (Standard Error of the Mean). Les caractéristiques des animaux et l'activité de la citrate synthase sont comparées en utilisant une Anova à une voie. Les doses-réponses pour les différents groupes sont comparées en utilisant une Anova à deux voies mesures répétées. Pour chaque test, le niveau de significativité est fixé pour $p < 0.05$. Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Statistica 7.1, StatSoft, France.

- Résultats

Les résultats sur la glycémie montrent que les animaux sont bien rendus diabétiques suite au traitement à la STZ. Les résultats pour la variation du poids et du citrate synthase prouvent l'efficacité de l'entraînement. On observe une relaxation endothélium-dépendante induite par l'ACh et l'ADP β S sur les anneaux d'aortes précontractés à la phényléphrine (PE). On note une augmentation de la contraction à la PE et une diminution de la relaxation induite par l'ACh et l'ADP β S ($p < 0.05$) chez les rats diabétiques comparés au groupe contrôle. On ne note pas d'augmentation de la relaxation endothélium-dépendante induite par l'ACh et l'ADP β S chez les rats diabétiques. L'addition de la N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester inhibe

la synthèse du NO chez les groupes de rats diabétiques et contrôles. Ceci est expliqué par une forte inhibition de la relaxation endothélium-dépendante induite par l'ACh et l'ADP β S.

- **Conclusion**

La présence du LNAME induit une diminution significative de la relaxation endothélium-dépendante à l'ACh et à l'ADP β S. Ce résultat est en accord avec la littérature et confirme l'implication du NO/EDRF dans la relaxation endothélium-dépendante autant chez les groupes contrôles que diabétiques. Notre étude montre qu'un entraînement intense ne corrige pas les dysfonctionnements endothéliaux causés par le diabète. La relaxation endothélium-dépendante demeure inchangée après 8 semaines d'entraînement intense. Ce qui pourrait s'expliquer, par le découplage du cofacteur BH4 avec la NOSe ou une baisse de la biodisponibilité du NO et une surproduction d'anions superoxyde.



ORIGINAL INVESTIGATION

Open Access

Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta

Mohamed Sami Zguira^{1,2,3*}, Sophie Vincent^{1,2}, Solène Le Douairon Lahaye^{1,2}, Ludvine Malarde^{1,2}, Zouhair Tabka³ and Bernard Saïag^{1,2}

Abstract

Background: The aim of this study was to examine the effects of intense physical training on vascular function in streptozotocin-diabetic rats. We focused on the endothelium-dependent relaxation (EDR) induced by acetylcholine (ACh) and stable ADP adenosine-5'-O - (2-thiodiphosphate) (ADP β S).

Methods: Control or diabetic male Wistar rats (n=44) were randomly assigned to sedentary or trained groups. The training program consisted in a regular period of running on a treadmill during 8 weeks (10° incline and up to 25 m/min, 60 min/day). The reactivity of isolated thoracic aorta rings of healthy, diabetic and/or trained has been tested.

Results: ACh and ADP β S-induced EDR were observed in phenylephrine (PE) pre-contracted vessels. As compared to sedentary control group, diabetic rats showed an increase in PE-induced contraction and a decrease in ACh and ADP β S-induced EDR (p<0.05). Moreover, there were no increase in ACh and ADP β S-induced EDR in diabetic rats. N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester inhibited the nitric oxide synthase in diabetic and control rats, thereby resulting in a strong inhibition of the EDR induced by ACh and ADP β S (10⁻⁶ M).

Conclusion: Diabetes induced an endothelium dysfunction. Nevertheless, our intense physical training was not effective to restore the aorta endothelial function.

Keywords: Endothelial relaxation, Training, Acetylcholine, ADP β S, Diabetic rat

Introduction

The endothelium provides a cellular lining to all blood vessels in the circulatory system and forms a structural barrier between the vascular space and the tissues. Endothelial cells (ECs) regulate vascular flow and basal vasomotor tone by the highly controlled release of vasodilators (nitric oxide (NO) and prostacyclin (PGI₂)) and vasoconstrictors [1]. NO is generated in ECs by the oxidation of L-arginine to L-citrulline by the NO synthases (NOS) enzymes family. The endothelial NOS (eNOS) isoform is constitutively active but is further induced by receptor dependent agonist such as thrombin, adenosine 5-diphosphate, bradykinin and substance P [2,3]. Shear stress also stimulates eNOS

activity by virtue of a shear response consensus sequence GAGACC in the eNOS gene promoter [4]. NO has pleiotropic effects on the vasculature. It causes vascular smooth muscle relaxation by binding to guanyl cyclase hence maintaining basal vasomotor tone. It also plays a critical role in the inhibition of thrombosis by inhibiting platelet adhesion activation and agonist-induced secretion. Moderate exercise training is well known to induce beneficial effects by improving Endothelial Function (EF) and EDR in healthy subjects [5-8]. Efficiency of training depends on both duration and frequency of that type of exercise [2,9-11]. Training, carried out in variable intensities of exercise, allows authors to note that moderate intensities potentiate the endothelium-dependent-relaxation (EDR) [2].

Diabetes is a risk factor in the development of both macro- and microvascular diseases [12]. It has been established that diabetes is associated with vascular dysfunctions caused by an impairment of EDR [13,14].

* Correspondence: sami-zguira@hotmail.fr

¹Laboratory "Movement Sport and health Sciences", UFR APS University of Rennes 2, Avenue Charles Tillon, Rennes cedex 35044, France

²Laboratory "Movement Sport and health Sciences", ENS Cachan - antenne de Bretagne, Campus Ker Lann, Bruz, France

Full list of author information is available at the end of the article



© 2013 Zguira et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Endothelial dysfunction (ED) is commonly considered as a biomarker of cardiovascular risk and the importance of the endothelium in maintaining normal vascular function is also well recognized [15,16]. In patients with type 1 or type 2 diabetes, the forearm blood-flow (dilator) responses to ACh are reduced, suggesting an ED [17-19]. In type 1 diabetic animal model, EDR induced by ACh is also impaired. The decrease in NO bioavailability is one of the reasons in this altered-relaxation [20,21]. Moderate physical activity has been reported to be a major component in the clinical management of diabetic patients [22]. However, the effects of intense exercise training on EF in healthy or pathological subjects are scarce and controversial [23]. Thus, the medical community generally advises diabetic patients to undertake physical activity of moderate intensity (40 to 60% $\dot{V}O_{2max}$) for 20 to 30 minutes at least 3 to 5 times per week. As vigorous physical activity can acutely and transiently increase the risk of cardiovascular events, many practitioners encourage diabetic patients to avoid intense and heavy exercise. However, many type 1 diabetic athletes are known to practice at a high level of competition and to win Olympic medals, leads us to believe that intense sports activity is not necessarily detrimental to type 1 diabetic patient. Moreover, recently, our laboratory showed that intense exercise training combined to insulin treatment had beneficial effects on basal cardiac function and adaptation in expression and responsiveness of cardiac receptors in type 1 diabetic rats [24,25]. Furthermore, high intensity training can be more effective than moderate intensity training to improve cardiovascular health and clinical outcome in patients with metabolic syndrome [26]. Other data showed that a high-intensity interval training model was effective for improving skeletal muscle mitochondrial capacity and functional exercise performance [27]. Finally, mechanism of the ACh-induced EDR is nowadays well known in diabetic or healthy subjects [28-30], on the contrary, stable ADP adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) ADP β S-induced EDR mechanisms have been described so far only in healthy rats. The ADP β S-induced relaxation is endothelium-dependent, mediated by P2Y purinoreceptors, at least in part linked to NO and prostacyclin release, and eventually Endothelium-Dependent Hyperpolarizing Factor (EDHF) [31]. To our knowledge, the effects of moderate and intensive training on ADP β S-induced EDR on healthy and diabetic subjects or rats are not documented. This study aimed to evaluate the effects of intense exercise training on EDR in diabetic rats as well as the NO-EDR induced by ACh and ADP β S.

Materials and methods

Experimental model

Animal experiments were conducted according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. All

experimental protocols were approved by the institutional Animal Care and Use Committee of Rennes University (France) and were carried out following the French Agricultural Ministry's to the care and use of laboratory Animals. This study meets the ethical standards in sports and exercise science research of the international journal of sports medicine [32]. The study was conducted in male Wistar rats, housed in an animal room on an inverse 12:12-h light-dark cycle (temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$) and given access to water and food ad libitum. The rats ($n = 44$; from Janvier, France), 9 week-old at the beginning of the experiment, were randomly divided into 4 groups: sedentary control (SC, $n = 10$), trained control (TC, $n = 10$), sedentary diabetic (SD, $n = 14$), and trained diabetic (TD, $n = 10$).

Induction of experimental streptozotocin (STZ)-induced diabetes

This experimental model of rats made diabetic with streptozotocin (STZ) injection has been validated in previous studies [24]. Animals were injected with either an intraperitoneal single dose of STZ in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 (45 mg/kg) (SD, TD) or citrate buffer only (SC, TC). Three days later, blood glucose levels were determined using a glucometer (MediSense Optium). The onset of diabetes was determined by blood glucose concentration > 250 mg/dL. The detection of ketone bodies, using a glucometer or urinary strips (Keto-Diastix[®] - Bayer Diagnostic) and body weight loss was used to confirm diabetes.

Exercise training program

One week after the STZ or citrate buffer injection, animals were exercised. Physical training consisted in a progressive running up to 25 m/min, 60 min, 5 days/week (for 8 weeks), as previously validated in our laboratory in same models [24,25] on a rodent treadmill (Exer 3/6 treadmill, Columbus Instruments) set at an incline of 10° . For the first 2 weeks, each exercise bout consisted of 10 min of running at 20 m/min. The following 3 weeks consisted progressively of 40 min at 22 m/min. for the remaining 3 weeks of the protocol; the duration was increased to 60 min at 25 m/min. Only animals which ran steadily on the treadmill were included in the study. All rats were sacrificed 24 h after the last training session.

Anesthesia & sacrifice

24 to 48 h after the last session of exercise to avoid immediate effects of exercise [2], animals were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg) administered intraperitoneally. The thoracic aorta were gently removed and immediately stored in a Krebs-Henseleit solution oxygenated and maintained at 37°C (pH 7.4) for vascular analyses. The gastrocnemius tissue was

removed and immediately frozen in liquid nitrogen for subsequent analyses.

Citrate synthase activity

Frozen gastrocnemius tissue (200 mg) was used to assay citrate synthase (CS) activity. Muscle samples were homogenized (1/10 w/v) in a buffer solution pH 7.5 containing Na_2HPO_4 (0.1 mol.L⁻¹), NaH_2PO_4 , H_2O (0.1 mol.L⁻¹), and EDTA (2 mmol.L⁻¹) for 20s at 30000 rpm with a polytron. The homogenate was then sonicated 6 x 10s and centrifuged at 1500 G for 13 min at 4°C in duplicate. Citrate synthase activity was spectrophotometrically determined in duplicate in protein extracts at 25°C. Results were expressed in $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{gTissue}^{-1}$ for each group. [24,25].

Preparation of aortic rings for vascular analyses

The removed-thoracic aorta were stored in a Krebs-Henseleit solution oxygenated and maintained at 37°C (pH 7.4) (composition in mM: NaCl 95, KCl 5, MgSO_4 1.2, KH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 24.9, CaCl_2 2.6, glucose 10) and bubbled with 95% O_2 -5% CO_2 . The surrounding connective tissue was carefully removed and rings (5 mm width) were prepared. Extreme care was taken not to stretch or damage the luminal surface of the aorta to ensure the integrity of the endothelium. The rings of the proximal portion of the aortic arch were mounted horizontally under isometric conditions in a 15 ml organ bath by inserting two stainless-steel wires into the lumen, according to the Bevan & Osler method (1972) [33]. The tissue isometric tension (g) was recorded by a force-displacement transducer (EMKA Technologies, Paris, France) and an acquisition system (IOX, EMKA Technologies, Paris, France). Preparations were allowed to reach equilibrium for at least 60 minutes under a resting tension of 600-900 mg. Before the beginning of each study, the contractile function was verified by obtaining a KCl-induced contraction and the functional state of the endothelium was evaluated by observation of relaxation to ACh on a ring precontracted with phenylephrine (10^{-7} M). Only the endothelial intact rings (more than 50% relaxation to ACh) were used.

After the washout (3 times for 20 min), the concentration-response relationship of PE was determined. The percentage of relaxation was evaluated in function of the contraction obtained with a 75% maximal effect of PE concentration. The relaxation study used ACh or ADPBS added in a cumulative manner with an increase of the concentrations (from 10^{-6} M to 10^{-5} M for ACh or from 10^{-6} M to 10^{-7} M for ADPBS). Finally, the preparations were washed 3 times before the addition of L-NAME (10^{-5} M) until the reach of the basic tension observed (30 min). Then, the same protocol was applied with ACh and ADPBS under N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) conditions. In

the L-NAME result section, we will show relaxation data in response to a single dose of ADPBS (10^{-6} M).

Drugs used

The Acetylcholine (ACh), Phenylephrine (PE), N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) and streptozotocin (STZ) were obtained from Sigma (U.S.A.). The Adenosine-5'-O - (2-thiodiphosphate) lithium salt (ADPBS) was from Boehringer Mannheim (Germany). All concentrations are expressed as final molar concentrations in the organ bath.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM. Animal characteristics and CS activity were compared using a 1 way ANOVA and the dose-response curves were compared performed by a 2-way ANOVA for repeated measures followed by Student-Newman-Keuls post-ANOVA tests (Statistica 7.1 software, StatSoft France, 2005). Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Animal characteristics

Higher glycemia in SD rats than in SC rats ($p < 0.001$) confirmed the diabetic state. Training reduced but not restored the levels of blood glucose, which were lower in TD rats compared to the SD ($p < 0.001$) (Table 1). Body weights, at the end of the study, were significantly depressed in both SD and TD rats as compared to the SC rats ($p < 0.001$). SC rats had significantly higher body weights than TC rats ($p < 0.05$), whereas SD rats had significantly lower body weights than TD rats ($p < 0.05$) (Table 1). All together, blood glucose values and body weight in diabetic group confirm their pathological status. The levels of gastrocnemius CS activity ($\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}.\text{gTissue}^{-1}$) increased significantly ($p < 0.05$) in trained rats compared to their respective sedentary counterparts (Table 1).

Vasomotricity study

Phenylephrine (PE) Concentrations responses curves

No significant differences were observed between groups TC and SC. TD and SD were significantly different for concentrations from 10^{-7} M to 6.10^{-7} M (Figure 1).

Effect of diabetes on ACh and ADPBS-induced EDR

We observe that the ACh as ADPBS induced relaxations on aortic rings in healthy and diabetic rats. Relaxations obtained from diabetic rats are significantly reduced compared to control rats. $35.6 \pm 0.6\%$ and $26.4 \pm 1.5\%$ decreased-relaxation was reported for 10^{-5} M ACh-induced EDR (Figure 2) for 10^{-6} M ADPBS-induced EDR (Figure 2), respectively.

Table 1 General characteristics of animals

	Sedentary Control (SC) n = 10	Trained control (TC) n = 10	Sedentary diabetic (SD) n = 14	Trained diabetic (TD) n = 10
Body weight (g)	504.1 ± 6.3	478.3 ± 10.3*	293.1 ± 11.4 * †	380.2 ± 11.4 * † ‡
Blood glucose (mg/dl)	128.7 ± 3.7	124.3 ± 3.7	556.2 ± 13.6 * †	497.4 ± 23.8 * † ‡
Citrate synthase (μmol·min ⁻¹ ·g tissue ⁻¹)	56 ± 1	69 ± 4*	61 ± 6	100 ± 9 ‡

Data are presented as mean ± SEM. * = significantly different from sedentary control rats ($p < 0.05$), † = significantly different from trained control rats, ‡ = significantly different from sedentary diabetic rats ($p < 0.05$).

Effect of Intense exercise training on ACh and ADPβS-induced EDR in control and STZ-diabetic rats

The concentration-response curves to ACh and ADPβS were not different between TC vs SC and TD vs SD rats (Figures 2 & 3).

Effect of L-NAME on ACh and ADPβS-induced EDR in control and STZ sedentary diabetic rats

The L-NAME (10^{-6} to 10^{-5} M) inhibits the relaxations induced by ACh (Figure 4a, b) in both groups (healthy and diabetic). Less than 20% relaxation induced by ACh was still preserved. In the same way, L-NAME combined with ADPβS (10^{-6} M) limited the EDR to about 20% in both groups (Figure 5).

Discussion

Our study showed that diabetes decrease ACh and ADPβS-induced EDR about 35% and 26%, respectively. In this population, the ADPβS-induced EDR constituted original data. Intensive endurance training did not induce beneficial effects on EDR aorta in control group and did not reverse the vascular dysfunction induced by

the diabetic condition. In all groups, under L-NAME, the decrease in ACh or ADPβS-induced EDR confirmed that endothelial relaxations are mediated via NO pathway.

In our diabetic rat model, the higher blood glucose concentration compared to healthy animal one confirmed the absence of insulin secretion subsequent to the STZ-treatment. Our training program lead to the level decrease the level of blood glucose, which was lower in TD compared to the values of their counterparts. Moreover, the drastic decrease in body weight reinforced the diabetic status of animals. Training of diabetic rats led to weight gain due to the increased-muscle mass, reduced weight loss but did not restore a normal body weight such as in healthy animals. Therefore, these observations are in agreement with literature data reporting changes in diabetic (type 1) animals body weight [8,24]. The CS increase activity demonstrated the efficiency of our training program. The same training program induced a higher increase in CS activity in STZ-diabetic rats that it did in control rats (TD, +56% vs

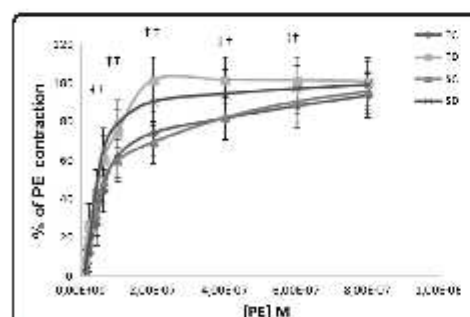


Figure 1 Concentration dependent contraction of phenylephrine (PE). Concentration dependent contraction of phenylephrine (PE) on thoracic aorta rings obtained from sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (SD) and trained diabetic (TD) groups. Tension is expressed as % relaxation on initial contraction with PE. Values are expressed as mean ± SEM. * Significantly different from sedentary diabetic rats ($p < 0.05$). † Significantly different from trained diabetic rats ($p < 0.05$).

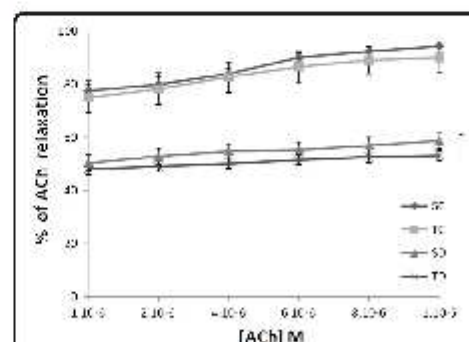
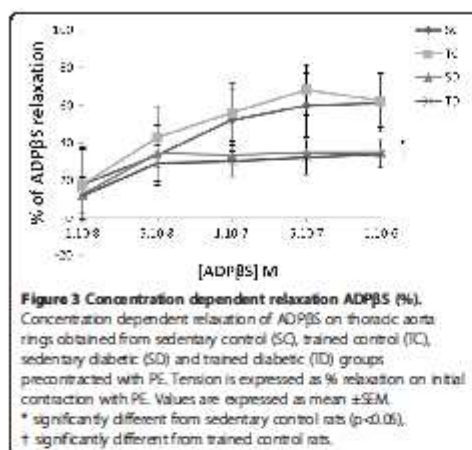


Figure 2 Concentration dependent relaxation of acetylcholine (ACh). Concentration dependent relaxation of acetylcholine (ACh) on thoracic aorta rings obtained from sedentary control (SC), trained control (TC), sedentary diabetic (SD) and trained diabetic (TD) groups precontracted with PE. Tension is expressed as % relaxation on initial contraction with PE. Values are expressed as mean ± SEM. * Significantly different from sedentary control rats ($p < 0.05$), † significantly different from trained control rats.



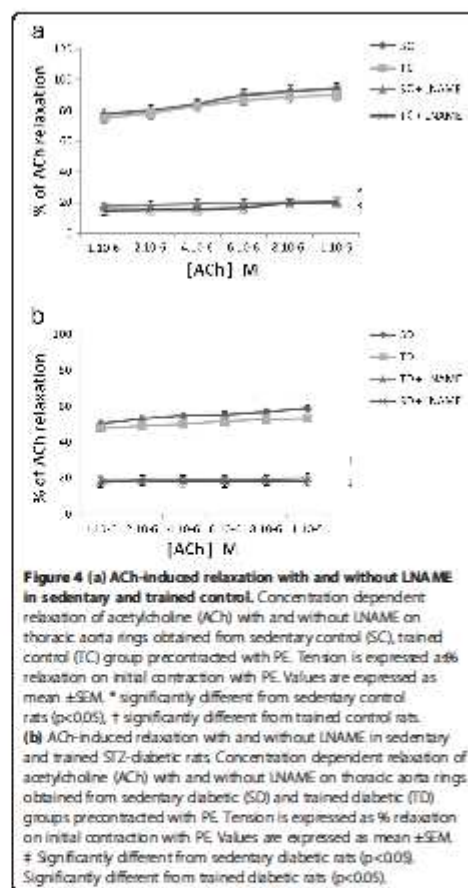
TC, +24%) (Table 1) because it was probably more intense for diabetic rats [22,34,35].

The vasoconstriction increase is induced by PE in STZ-diabetic rats

We observed a significantly increase in contractility induced by PE in diabetic groups as compared to the control ones for concentrations from 10^{-7} M to $6 \cdot 10^{-7}$ M. Therefore, the different concentration-responses curves observed were in agreement with Martinez-Nieves and Dunbar study (1999) [36]. These authors postulated that changes in vascular smooth muscle could be involved in the vascular tone increase observed in diabetic subjects. The mechanism of this potentiation of the PE-induced contraction is due to increasing sensitivity of alpha adrenergic receptors [36].

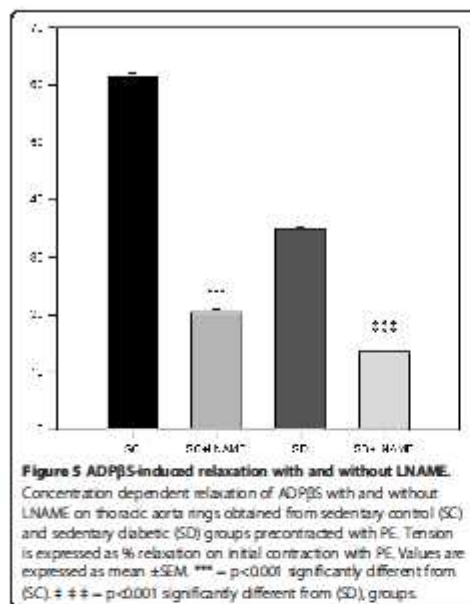
The decrease in ACh and ADPβS-induced EDR supports an endothelial dysfunction in STZ-diabetic rats

Diabetes is known for reducing the ACh-induced relaxation [21,37,38]. The nature of the studied receptors mediating respectively ACh (Muscarinic (M1/3) receptors) and ADPβS (Purinergic (P2Y) receptors) induced EDR could have an impact on the importance of reducing the EDR in diabetic rats. ADPβS has been shown as an inducer (via P2Y purinergic receptors) of insulin secretion by the beta cells and vasodilatation of pancreatic vascular bed [39]. It is important that along with the secretion of insulin, a vasodilatation must occur. This vasodilatation fosters the effect of insulin and therefore responds to the metabolic and energetic needs. Moreover, if we take into account the physiopathology, we may notice that a dysfunction in the endothelium of pancreatic vascular bed can only perturbate the glycemia regulation. It



appeared that the reduction of the EDR was higher in diabetic rats when induced by ACh than by ADPβS, respectively. ACh as ADPβS induced EDR are mediated by NO released from endothelium and consecutively the stimulation of soluble Guanylate cyclase (GMPc). The decrease in NO bioavailability was probably one of the reasons in this relaxation alteration. Therefore, the histamine-induced EDR was potentiated on the diabetic rat [40]. In diabetic rats, the decrease in ADPβS-induced EDR was supported by previous reports [41].

It is obviously noticed that the nucleotides (such as the ADP) -present in the extracellular spaces- contribute to the local regulation of the vascular diameter as well as they play a key role in pathophysiological states. Concerning the ADP and its interaction with the endothelial P2Y1 receptors in a number of diabetic rats type



1 (obtained as a result of STZ treatment), it has been recently proposed that the signaling via NO will be reduced subsequently after an interaction with P2Y1 receptors [42].

In fact, any disturbance of the cellular signaling via the P2 receptors stimulated by ADPβS at the level of the endothelium of pancreatic vascular bed as well as at the level of the cells β, can only lead to a dysfunction regarding the glycemia regulation. A new trend of research appears to remove and rectify this dysfunction targeting the system of signaling mediated by purinergic receptors P2Y.

Indeed, the ADP (as well as ATP, AMP, and adenosine) can hyperpolarize the membrane of the endothelial cell. However, ATP and ADP depolarize the membrane of the smooth muscular cell [43]. As noticed before, associated with the P2Y1 (endothelial receptors) ADP or ADPβS would stimulate the production of EDHF by endothelial cells. In fact, EDHF can induce hyperpolarisation of the vascular smooth muscle membrane thus a vasodilatation would occur. ADPβS is very important for glucose regulation because Hillaire-Buys et al. (2003) [44] reported that ADPβS linked to P2Y was able to alter endothelium-dependent vasorelaxation in vascular pancreatic bed. Specific agonists as well as ADPβS to P2Y-receptors induced NO/EDRF and EDHF secretion by endothelial cells. EDHF act on vascular smooth muscle

cell, opening K⁺ channel, induce hyperpolarisation and relaxation [40].

Intense exercise training did not potentiate and/or reverse the ACh and ADPβS-induced EDR in control and in STZ-diabetic rats

Our intensive training program did not potentiate and/or reverse the ACh and ADPβS-induced EDR in both groups. This phenomenon could be explained by an excessive ROS production as compared to the positive shear stress effect induced by this exercise. In fact, physical exercise inducing shear stress is the main stimulus of the NO pathway [45]. Shear stress stimulates the membrane receptors sensitized to the stretching of the endothelial cells, and as a result exercise induces vasodilatation. Consequently, EDR should have been greater with training. On the other hand, intense and exhaustive exercises are well known to induce oxidative stress and an excess of ROS production [46]. Previous studies realized on isolated thoracic rat aorta in hypoxic conditions (using drugs) showed that ROS (O₂^{•-}, OH[•], ...) alters vasomotricity [47]. NO capturing through the superoxide anion associated with a production of pro-oxidant reactive oxygen species (ROS) can support this hypothesis. Moreover, a correct EDR via the NO[•]/EDRF pathway requires a coupling between receptors, NOS and cofactor BH4. The inefficiency of our exercise training program to reduce the ED (and enhance EDR) in diabetic rats can be explained by the fact that intense training promotes oxidant stress and leads to decoupling eNOS-cofactor BH4 [17,35,48]. Internal data of our lab supported this hypothesis. Indeed, diabetic rats or trained diabetic rats exhibited an hyperglycemic-induced O₂^{•-} overproduction, resulting from activation of NOX, eNOS, and Xanthine Oxidase.

In addition, the production of superoxide anion, lactic acid and other molecules may be involved when the shear stress is too high. Consequently, we hypothesized that our endurance training was performed at too great intensity for diabetic population, while for more moderate intensities beneficial effects are typically observed on EDR [15]. Consequently, we can conclude that intense training program was not adapted to reduce an ED in type 1 diabetic rats.

ACh and ADPβS-induced EDRs are mediated via NO pathway in control and STZ-diabetic rats

Our results demonstrated that the NO[•]/EDRF pathway is involved in the molecular mechanism of these EDR as described in other studies [29,31]. In particular, we observed that the NO[•]/EDRF pathway was implicated in the ACh and ADPβS-induced EDR at the same ratio as in control and STZ-diabetic rats. The fraction of ACh and ADPβS-induced EDR not inhibited by L-NAME

could be eventually mediated by PGI₂ or EDHF [31]. Consequently, it would be interesting to explore the consequences of training in normal or diabetic animals, towards prostacyclin and that of EDHF. It will be intriguing to pursue these investigations particularly with regard to molecular interactions and the metabolism of NO with molecules involved in oxidative stress (superoxide anion, hydroxyl anion, superoxide dismutase, catalase...), as demonstrated in isolated rat thoracic aorta in hypoxic conditions [38,49]. Classically, it was described that oxidative stress is increased by exercise training [50-52]. When normally at rest, however, a low oxidative stress level is maintained. Obtaining a correct EDR via the NO²/EDRF pathway requires a coupling between receptors, NOS and cofactor BH₄. It would be interesting in the future to determine whether the reduction of EDR in diabetic rats is due to BH₄-eNOS uncoupling or another molecule.

Conclusion

This study showed that intense exercise training cannot correct endothelial dysfunction, as measured by ACh and ADP₂S-induced EDR. EDR did not change in diabetic rats after 8 weeks of intense exercise training. Such findings will most likely recommend the practice of moderate intensities for exercise training to induce benefits on vascular function. It is necessary to pursue a better understanding of the mechanisms of ED in the future.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MSZ was responsible for the design, conception of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, and drafting of the manuscript. SV was responsible for the conception of the experiment and collection of the data. SLD and LM were responsible for exercise training protocol. ZT has participated in interpretation of the data. ES supervised the study and was responsible for the design, conception of the experiments, interpretation of the data, and drafting of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

We gratefully thank the regional association of endothelium research (ARE), the Langlois Foundation (West Foundation), Prof Paul Delamarche, Prof Arlette Grégoire-Delamarche, Prof Alain Legrand, for assistance, Prof François Carrel and Prof Eric Bellissant for their home, Mrs Catherine Lemesle, Christine Dutail and Marie-Josée Ferrand-Some from the laboratory of Medical Physiology (Faculty of Medicine, Rennes 1, France) for their technical assistance.

Author details

¹Laboratory "Movement Sport and health Sciences", UFR APS University of Rennes 2, Avenue Charles Tilhon, Rennes cedex 35044, France. ²Laboratory "Movement Sport and health Sciences", ENS Cachan -antenne de Bretagne, Campus Ker Lann, Buz, France. ³Clinical Laboratory of Physiology, Medical School of Sousse, Sousse, Tunisia.

Received: 10 November 2012 Accepted: 4 February 2013
Published: 11 February 2013

References

- Harrington LS, Lundberg MH, Rozario A, Mitchell JA: Reduced endothelial dependent vasodilation in vessels from TLR4-/- mice is associated with increased superoxide generation. *Cardiovascular Pharmacology* 2011, **54**:608-611.
- Heylen E, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thibaut S, Salig B: Effect of training frequency on endothelium-dependent vasodilation in rat. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2008, **15**:52-8.
- Pellegrini M, Berthelot A, Houdayer C, Gaume V, Dedier V, Laurent P: New insights into the vascular mechanisms underlying the beneficial effect of swimming training on the endothelial vasodilator function in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 2007, **190**:35-42.
- Vanessa RC, Nishida K, Alexander RW, Harrison DG, Murphy TJ: Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochim Biophys Acta* 1994, **1218**(3):413-20.
- De Moraes C, David AF, Rosconi LV, Arturios E, Zanetti A: Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol* 2008, **8**:12.
- Borlato Pérez A: Exercise as the cornerstone of cardiovascular prevention. *Rev Esp Cardiol* 2008, **61**:514-518.
- Delaney LE, Arco-Escueta AM, Kuroki K, Laughlin MH: Exercise training improves vasoreactivity in the knee artery. *Int J Sports Med* 2012, **33**:114-22.
- DeSouza CA, Shapiro LE, Clevenger CM, Dennero FA, Morahan KJ, Tanaka H, Seals DR: Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation* 2000, **102**:1351-7.
- Haram PM, Adams V, Kaml O, Brubakk AQ, Hambrecht R, Ellingsen O: Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2006, **13**:585-91.
- Heylen E, Simon B, Guerrero F, Elalim JF, Salig B, Mansourati J: Reactive hyperaemia in the forearm skin of highly trained windsurfers. *Int J Sports Med* 2005, **26**:823-6.
- Spieler SA, Delp MD, Meiringer CJ, Donato AJ, Ramsey MW, Muller-Delp JM: Effects of aging and exercise training on endothelium-dependent vasodilation and structure of rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol* 2004, **559**:947-58.
- Xue G, Luis A, Martinez L, Zhang C: Endothelium-derived hyperpolarizing factor and diabetes. *World J Cardiol* 2011, **3**:25-31.
- Bakker W, Brigo EC, Sipkema P, VanHinsbergh WH: Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycaemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009, **335**:165-189.
- Telwa-Lemos E, Nunes S, Teixeira F, Reis F: Regular physical exercise training assists in preventing type 2 diabetes development: focus on its antioxidant and anti-inflammatory properties. *Cardiovasc Diabetol* 2012, **11**:32.
- Desfield JE, Holcox JF, Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* 2007, **115**:128-35.
- Malorana A, O'Driscoll G, Dembo L, Goodman C, Taylor R, Green D: Exercise training, vascular function, and functional capacity in middle-aged subjects. *Med Sci Sports Exerc* 2001, **33**:2002-8.
- Delp MD, Behnke BJ, Spieler SA, Wu G, Muller-Delp JM: Aging diminishes endothelium-dependent vasodilation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol* 2008, **586**:161-8.
- Erdem DH, Schiffman RL: Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004, **15**:1983-92.
- Gewaltig MT, Kojda G: Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc Res* 2002, **55**:250-60.
- Mustafa S, Sharma V, McNeill JH: Insulin resistance and endothelial dysfunction: Are epoxycysteine oxidase. *Exp Clin Cardiol* 2009, **14**:41-50.
- Okumura E, Ohtani CE, Gul Celik F, Uike S: Apocynin restores endothelial dysfunction in streptozotocin diabetic rats through regulation of nitric oxide synthase and NADPH oxidase expressions. *J Diabetes Complications* 2010, **24**:415-423.
- Heyman E, Toulain C, Delamarche P, Berthon P, Brard D, Yousef H: Exercise training and cardiovascular risk factors in type 1 diabetic adolescent girls. *Pediatr Exerc Sci* 2007, **19**:408-419.
- Walsh JH, Blomberg W, Malorana A, Best M, O'Driscoll G, Taylor RB, Green D: Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol* 2003, **95**:20-5.
- Le Douarin LS, Grégoire-Delamarche A, Malardé L, Vincent S, Zguira MS, Vincent S, Lemoine Mont S, Delamarche P, Zouhal H, Camé F, Bekono RR

- Intense exercise training induces adaptation in expression and responsiveness of cardiac β -adrenoceptors in diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2010, **9**:72.
25. Le Douron LS, Rebillard A, Zguira MS, Malardé L, Saïg B, Gratas-Delamarche A, Camé F, Bikono FR: Effects of exercise training combined with insulin treatment on cardiac NO β signaling pathways in type 1 diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 2011, **347**:53–62.
 26. Tjønna AE, Lee SJ, Rognmo Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, Loennechen JP, Al-Shara QY, Skogdahl E, Seland SA, Kemi OJ, Najjar SM, Wisloff U: Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation* 2008, **118**:346–354.
 27. Little JP, Saffar A, Wilkin GP, Lampolsky MA, Gibala MJ: A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. *J Physiol* 2010, **588**:1011–1022.
 28. Helzer T, Hinchliffe A, Albers S, Rohm K, Kohlchütter A, Meinertz T: Beneficial effects of alpha-lipoic acid and ascorbic acid on endothelium-dependent nitric oxide-mediated vasodilation in diabetic patients: relation to parameters of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001, **31**:53–61.
 29. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, **288**:373–6.
 30. Minami A, Ishimura N, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y, Nakaya Y: Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic rats. *Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. Atherosclerosis* 2002, **162**:85–92.
 31. Saïg B, Hilaire-Buys D, Chapal J, Petit F, Pape D, Rault B, Alah H, Loubadès-Martani MM: Study of the mechanisms involved in adenosine-5'-O-2'-thiophosphate-induced relaxation of rat thoracic aorta and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol* 1996, **118**:804–10.
 32. Harris DJ, Atkinson G: Update - ethical standards in sport and exercise science research. *Int J Sports Med* 2011, **32**:819–821.
 33. Bevan, Oliver: A direct method for recording tension changes in the wall of small blood. *Agents Action* 1972, **2**:257–80.
 34. Gratas-Delamarche A, Heyman E: Effects of type 1 diabetes and of training on physical fitness. *Science Sports* 2006, **21**:57–61.
 35. Rush JW, Laughlin MH, Woodman CR, Price EM: SOD-1 expression in pig coronary arterioles is increased by exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000, **279**:H668–H676.
 36. Martinez-Nieves B, Dunbar J: Cardio-vascular dilatory responses to sodium Nitroprusside (SNP) and Alpha-Adrenergic antagonism in female and male normal and diabetic rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990, **222**:90–8.
 37. Junqueiro D, Rival Y: Metabolic syndrome: which definition for what treatment? *J Med Sci* 2005, **21**:1045–53.
 38. Kasouk K, Norkkila M, Yuzuka K: Impairment of endothelium-dependent relaxation and changes in levels of cyclic GMP in aorta from streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1989, **97**:614–618.
 39. Chapal J, Hilaire-Buys D, Bertrand G, Pujate D, Petit F, Loubadès-Martani MM: Comparative effects of adenosine-5'-triphosphate and related analogues on insulin secretion from the rat pancreas. *Fundam Clin Pharmacol* 1997, **11**:537–45.
 40. Matsumoto T, Yoshizawa S, Wakabayashi K, Kobayashi T, Kamata K: Effect of chronic insulin on cromakalim-induced relaxation in established streptozotocin-diabetic rat basilar artery. *Eur J Pharmacol* 2004, **504**:119–127.
 41. Csanyi G, Lepan I, Resch T, Telegdy G, Szabo G, Mész Z: Lack of endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) up-regulation in endothelial dysfunction in aorta in diabetic rats. *Pharmacol Rep* 2007, **59**:447–455.
 42. Ishida K, Matsumoto T, Taguchi K, Kamata K, Kobayashi T: Mechanisms underlying reduced P2Y β -receptor-mediated relaxation in superior mesenteric arteries from long-term streptozotocin-induced diabetic rats. *Acta Physiol (Oxf)* 2013, **207**:130–41.
 43. Chen G, Suzuki H: Endothelium-dependent hyperpolarization elicited by adrenergic compounds in rabbit carotid artery. *Am J Physiol* 1991, **260**:H37–42.
 44. Hilaire-Buys D, Peyrère H, Urick N, Saïg B: Dysfonctionnement endothélial et diabète: aspect fondamentaux et perspectives thérapeutiques. *Angéologie* 2009, **55**:33–40.
 45. Laughlin MH, Olman CL, Bowles DK: Exercise training-induced adaptations in the coronary circulation. *Med Sci Sports Exerc* 1998, **30**:352–60.
 46. Grossard C, Machefert G, Rannou F, Zouhal H, Sergeant C, Chevanne M, Cillard J, Gratas-Delamarche A: Physical fitness and plasma non-enzymatic antioxidant status at rest and after a wingate test. *Can J Appl Physiol* 2003, **28**:79–92.
 47. Saïg B, Shariort V, Bodin P, Catheline M, Pape D, Alah H, Burnstock G: Pharmacological evidences for free radical implications in endothelium dependent hypoxic responses of the rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol* 1999, **372**:57–63.
 48. Sinder AL, Delo MQ, Reyes R, Wu G, Müller-Gelp JM: Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. *J Physiol* 2009, **587**:3885–3897.
 49. Saïg B, Milon Q, Alah H, Rault B, Van den Orlésch J: Constriction of the smooth muscle of rat tail and femoral arteries and dog saphenous vein is induced by uridine triphosphate via pyrimidinocceptors, and by adenosine triphosphate via P2X purinocceptors. *Blood Vessels* 1990, **27**:353–64.
 50. Alessio HM: Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 1993, **25**:218–224.
 51. Alessio HM, Hagaman AE, Fukumori BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL: Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2000, **32**:1576–1581.
 52. Dato S, Fraser H, Yuen VG, McNeill JH: Improvement in cardiac function in streptozotocin-diabetic rats by salt loading. *Can J Phys Pharmacol* 1994, **11**:1313–1471.

doi:10.1186/1475-2840-12-32

Cite this article as: Zguira et al.: Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta. *Cardiovascular Diabetology* 2013 **12**:32.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



ARTICLE 2

DEUXIEME PARTIE

Title : Effects of an acute exercise on endothelium function in athletics young subjects: a case control study

Authors

Mohamed Sami Zguira^{1-2,3,*} Hanène Miâadi-Messaoud¹, Helmi Ben saad^{1, 4}, Haythem Debbabi¹, Bernard Saiag²⁻³, Zouhair Tabka¹

Affiliations

¹ Clinical Laboratory of Physiology. Medical School of Sousse, Sousse, Tunisia. 4002 Sousse,

² Laboratory “Movement Sport and health Sciences”, UFR APS University of Rennes 2, Avenue Charles Tillon, Rennes cedex 35044, France.

³ Laboratory “Movement Sport and health Sciences”, ENS Cachan –antenne de Bretagne, Campus Ker Lann, Bruz, France

⁴ Research Unit: secondary prevention after myocardial infarction, N: 04/UR/08-18. Faculty of Medicine of Sousse. Sousse. Tunisia.

Effets d'un exercice aigu sur la fonction endothéliale de sujets jeunes et entraînés : étude de cas témoins

- But de l'étude

Cette étude aura pour but d'étudier la réactivité vasculaire du flux sanguin au niveau de la peau de l'avant-bras en réponse à une iontophorèse d'ACh (qui est un vasodilatateur endothélium dépendant) avant et après un exercice aigu.

- Matériels et méthodes

Pour cette étude on a recruté 49 sujets mâles sains qu'on a répartis en deux groupes en fonction de leurs valeurs de la consommation maximale d'oxygène. Le premier groupe comprend 29 sujets entraînés et le deuxième 20 sédentaires ayant en moyenne 15 ± 1 an. Tous les sujets sont au même stade de maturation (stade 4, selon Tanner et coll, 1962). Tous les sujets entraînés participent à des compétitions régionales ou nationales et s'entraînent régulièrement (critère principal de sélection des sujets entraînés). Nous nous sommes basés sur la valeur de la $\dot{V}O_{2max}$ pour sélectionner les sujets entraînés (on a choisi des sujets ayant des valeurs supérieures à $45 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$). Un examen clinique avec mesure de la pression artérielle et des mesures anthropométriques ont été effectués.

- Epreuve d'exercice musculaire :

Afin de déterminer la $\dot{V}O_{2max}$ et de former les groupes, une épreuve d'effort maximal est effectuée 8 jours avant le début de l'étude. Les sujets ont effectué une épreuve d'effort maximale sur un ergocycle (Ergoline, Bitz, Germany). Chacun des sujets bénéficie d'un

protocole personnalisé et individualisé (American Thoracic Society/American College of Chest Physicians, 2003). Avant chaque expérimentation, une calibration du volume et de l'analyseur de gaz est effectuée. Durant le test, $\dot{V}O_2$ par kilogramme de poids, $\dot{V}CO_2$ expirée, O_2 inspiré, le quotient respiratoire ($\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$), la ventilation (\dot{V}_E) le volume courant et la fréquence respiratoire sont enregistrés en continu par un appareillage adapté le ZAN600 (ZAN 600 Ergotest, ZAN Mebgera'te GmbH, Germany). La fréquence cardiaque est mesurée en continu par un ECG (ZAN 800). La saturation en oxygène est contrôlée tout au long du test par un saturomètre (Model 9847, Nonin Medical, Inc., Minneapolis, MN). L'arrêt de l'épreuve dépend de la détection d'au moins 3 des critères suivants :

- Le plafonnement de la consommation d'oxygène en dépit d'une augmentation de l'intensité de l'exercice
- Une fréquence cardiaque supérieure ou égale à la fréquence cardiaque théorique
- Un quotient respiratoire supérieur à 1.1
- Une lactatémie supérieure à 0.8 mmol.L-1
- Un épuisement apparent du sujet

Nos sujets ont été familiarisés avec tous les équipements et les procédures de l'expérimentation. On a demandé à nos sujets de se reposer la veille de l'épreuve et surtout de bien s'hydrater.

- **Le laser doppler**

La vasodilatation endothélium-dépendante de la microcirculation cutanée est évaluée par la combinaison de l'iontophorèse et de la débimétrie par Laser Doppler. Un faisceau laser pénètre à travers la peau et une fraction de la lumière est réfléchiée en percutant les globules

rouges en mouvement dans la microcirculation cutanée avec modification de la fréquence selon le principe du Doppler. Les mouvements de fréquence sont convertis en un signal électrique, exprimé en unités arbitraires, proportionnel au nombre et à la vitesse des globules rouges, donc proportionnel à la perfusion sanguine cutanée.

Le matériel utilisé est composé :

D'un appareil laser Doppler : caractérisé par une longueur d'onde de l'ordre de 780nm et une fréquence de l'ordre de 32Hz. Il est équipé d'une sonde Laser Doppler liée à l'appareil par le biais de deux fibres optiques.

D'un générateur de courant (PF 382 b, Perimed AB, Periont Supply, Jarfalla, STOCKHOLM, Suède) : Ce générateur consiste en une batterie (9 volt) qui présente deux boutons de réglage, un pour le réglage de l'intensité du courant électrique et l'autre pour le réglage du temps. A ce générateur sont branchées une anode et une cathode.

Des Électrodes de référence (PF 384 b, Perimed, Jarfalla, suède) : C'est une électrode double face dont l'une est autocollante qui sera mise en contact avec la peau, alors que l'autre face sera en contact avec la cathode.

Des électrodes double face autocollantes ou électrode Laser Doppler : La première face permet de fixer la sonde à la zone de mesure, alors que la 2^{ème} face est centrée par un chiffon sous forme d'un disque qui sera le support de la substance administrée. Cette électrode sera fixée à l'anode de la batterie.

Un ordinateur équipé d'un logiciel Perisoft pour Windows System(PSW) : Ce logiciel est actuellement utilisé en clinique courante et dans le domaine de la recherche. Il permet d'enregistrer tous les signaux détectés par le Doppler Laser.

L'Acétylcholine : L'ACh utilisée est une solution préparée à 2% avec l'eau désionisée, soit 20g/L. La quantité de l'ACh déposée sur l'électrode double face est estimée à 80 microlitres

- **Le test**

Les sujets vont effectuer une exploration de la vasodilatation endothélium dépendante (à l'ACh) et indépendante (élévation de la température de la peau) au niveau de la microcirculation cutanée de l'avant-bras avant et après un exercice aigu.

- **Les principaux résultats**

- Pas de différences significatives pour l'âge et la taille par contre au niveau de l'IMC (indice de masse corporelle), le poids, la fréquence cardiaque de repos et la consommation maximale d'oxygène on note une différence significative ((sédentaires 40.05 ± 4.53 et entraînés 51.65 ± 5.76 ml.min-1.kg⁻¹) ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$, respectivement)
- La réponse moyenne de FSBF à l'ACh est significativement augmentée après un exercice à intensité croissante dans les deux groupes (349%).
- La réponse maximale de FSBF à l'ACh est significativement améliorée chez le groupe entraîné ($987\% \pm 78$) comparé au groupe sédentaire ($638\% \pm 42$) ($p = 0.001$) après un exercice aigu.

- **Conclusion**

La réponse de la FSBF à l'ACh qui induit une vasodilatation endothélium-dépendante est influencée par le degré de l'entraînement que ce soit avant ou après un exercice aigu.

Abstract

Aim: to investigate vascular reactivity on forearm skin blood flow (FSBF) in response to iontophoresis of acetylcholine (ACh), an endothelium dependent vasodilator after an acute exercise.

Materials and methods: 49 healthy male subjects 29 trained and 20 sedentary (recruited according to their oxygen consumption) participated in this case control study (mean age: 15 ± 1 year). Incremental exercise testing was performed based on an individualized and personalized exercise test protocol. FSBF was measured before and after exercise using a laser Doppler flowmeter in response to local iontophoresis of a cumulative dose of ACh.

Results: Although groups were not different in age, height or body mass index, weight, resting heart rate, maximum oxygen consumption was significantly different (sedentary 40.05 ± 4.53 and trained 51.65 ± 5.76 ml.min⁻¹.kg⁻¹) ($p < 0.05$; $p < 0.001$; $p < 0.001$, respectively). The mean response of FSBF to ACh was significantly increased after incremental exercise in the two groups (349%). Maximal FSBF response to ACh was significantly greater in trained ($987\% \pm 78$) than in sedentary ($638\% \pm 42$) ($p = 0.001$) after a single acute exercise.

Conclusion: Response of FSBF to ACh-induced endothelium dependant relaxation was affected by the level of training whether before or after an acute exercise.

Key-words: Exercise; endothelial dysfunction; forearm skin blood flow; laser Doppler flowmetry; iontophoresis; training; endothelium; nitric oxide; vasodilatation; acetylcholine.

Introduction

The prevalence of cardiovascular disease (CVD) has markedly increased in many countries (ie, in Tunisia its prevalence was 28.9%) and it's considered as a leading cause of death with a rate ranging between 27 to 30% every year (Elasmi et al. 2009). CVD in adults are laid in childhood and accelerated by the presence of comorbid conditions, such as obesity, diabetes, hypertension and dyslipidemia (Short et al. 2009). Furthermore, young Tunisian people are exposed earlier to CVD risk factors (Jammousi et al. 2012). One of the CVD risk biomarker in healthy subjects is endothelial dysfunction (ED). In fact it is well recognized the importance of the endothelium in maintaining normal vascular function (Conti AA and Macchi C. 2013). An ED disturbing the endothelium dependent relaxation (EDR) through nitric oxide (NO) with loss of the properties anti-atherogenic and antithrombotic of endothelium may have unnecessarily simultaneous causes (Deanfield et al. 2007). Exercise training induces adaptation of the cardiovascular system, resulting in improvement of oxygen intake by both cardiac and skeletal muscles (Fritzsche et al. 2000). The impact of exercise training on the endothelium is dependent on different factors of duration, frequency, intensity or volume (Goto et al. 2003; Johnson et al. 2011). While aerobic exercise (high intensity and long duration) is associated with a transient reduction of endothelium-dependent vasodilation in peripheral conduit arteries (Dawson et al. 2008; Rognmo et al. 2008; Zguira et al. 2013), moderate aerobic exercise appears to enhance its function (Tinken et al. 2009). The durations and frequencies conditions of this type of exercise are noticeably effective (Haram et al. 2006; Heylen et al. 2008; Maiorna et al. 2001). Other studies have shown also that exercise preserves endothelial function NO-dependent (Woodman et al. 2003, 2006; Thompson et al.

2003). Training realized with variable intensities of exercise allows observing that moderate intensities potentiate the EDR whereas raised intensities in animals and humans decrease the EDR with the increase of oxidant stress (Goto et al. 2003; Zguira et al, 2013). In addition, Kingwell et al. (1997) indicate that exercise may prevent ED and improve its function in normal subjects. In studies including human, noninvasive methods are usually favored because invasive studies were limited to a very small number of patients and an ethical problem. However, there is a noninvasive measurement method of microcirculatory blood flow used to assess the endothelial function. This method consists of inducing changes in regional blood flow by Laser Doppler Flowmetry (LDF) in responses to local infusion of vasoactive substances like ACh (Westerman et al. 1988; Morris et al. 1995). This method was previously used to assess whether the endothelial function is affected by type and intensity of exercise in healthy and pathologic subjects. However, it is not clear how exercise acutely affects EF. Many studies resulting from varied exercise protocols (Goto et al. 2003) present conflicting results and ambiguity in data analysis after exercise. To determine whether exercise is associated with a benefic effect on endothelial NO release, we investigated the endothelium-dependent and – independent vasodilation by measuring noninvasively the change in forearm skin blood flow (FSBF) in response to graded infusion of ACh, using combined LDF and heating probe, in two groups of healthy males trained and sedentary.

The purpose of the study was to investigate vascular reactivity on FSBF in response to ACh iontophoresis before and after an acute exercise in trained and sedentary young people. The null hypothesis is that there is no difference between mean values of their FSBF data.

Methods

Type of study

This was a case-control study spread over one year (from February 2010 to January 2011). It was conducted in the Department of Physiology and Functional Exploration at the Farhat Hached Hospital in Sousse, Tunisia. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, participants provided written consent and the study protocol were approved by the ethics committee of the Hospital.

Sample size

The null hypothesis (Suresh et al. 2012) was $H_0: m_1=m_2$ and the alternative hypothesis was $H_a: m_1=m_2 + d$, where d is the difference between two means and n_1 and n_2 are the sample sizes for the T and S groups, such $N = n_1 + n_2$. The total sample size was estimated using the following formula (Suresh et al. 2012) $N = [(r+1)(Z_{\alpha} + Z_{1-\beta})^2 \sigma^2] / r d^2$. Z_{α} is the normal deviate at a level of significance = 1.64 (5% level of significance), $Z_{1-\beta}$ is the normal deviate at 1- $\beta\%$ power with $\beta\%$ of type II error (0.84 at 80% statistical power); “ r ” equal to n_1/n_2 is the ratio of sample size required for two groups ($r = 0.67$ gives the sample size distribution as 1:1.5 for two groups. σ and d are the pooled standard-deviation (SD) and difference of FSBF means of two groups. These two values were obtained from a previous study based on a similar hypothesis (Roche et al. 2010) in which the researchers found that the mean baseline thermally stimulated skin blood flow (SkBF) (in perfusion units (PU)) in two groups were 11 and 9 and common SD was 3.5. The total sample size for the study was 47 males (30 T and 18 S).

Subjects general characteristics

49 healthy male subjects 29 trained and 20 sedentary (recruited according to their oxygen consumption) participated in this investigation (mean age: 15 ± 1 year). All subjects were in the same stage of maturation, as determined from questionnaire, which corresponded to Tanner Stage 4 (Tanner et al. 1962). Body mass was measured to the nearest 0.1 kg with the subjects in light clothing without shoes. Height was determined to the nearest 0.5 cm with a measuring tape fixed to the wall. The body mass index (BMI) was calculated as the ratio of mass (kg) to height² (m²). All the athletes participated in regional or national competitions, and were regularly trained. Selection was based firstly on the regular training (hour.week⁻¹) and secondly on the value of maximum oxygen consumption ($\dot{V}O_{2\max}$: beyond 45 ml.min⁻¹.kg⁻¹ subjects is considered trained). A complete medical examination was performed, including measurements of resting arterial blood pressure. History of familial or individual CVD and treatments were collected for each participant. Subjects with a history of CVD, hypercholesterolemia, liver disease, renal disease, or a smoking habit were excluded.

Maximal test

In order to determine $\dot{V}O_{2\max}$ and so select groups, a maximal aerobic exercise test was performed on a separate day (8 days before doing experimentation (D0)). Incremental exercise testing was performed on an electronically braked cycle ergometer (Ergoline, Bitz, Germany) based on an individualized and personalized exercise test protocol (American Thoracic Society/American College of Chest Physicians, 2003). Before each experiment, volume and gas analyzers were calibrated. During the test, $\dot{V}O_2$ per kilogram of body mass, carbon dioxide ($\dot{V}CO_2$) output, O₂ pulse, respiratory exchange ratio ($\dot{V}CO_2/\dot{V}O_2$), global

ventilation (\dot{V}_E) and its components tidal volume and breathing frequency were recorded continuously using a breath-by-breath automated exercise metabolic system (ZAN 600 Ergotest, ZAN Meßgerä'te GmbH, Germany). The ventilatory equivalents for O₂ and CO₂ were then calculated. Heart rate (HR) was monitored continuously using a 12-lead electrocardiogram (ZAN ECG, 800). The anaerobic threshold was determined by the ventilatory equivalents method (American Thoracic Society/American College of Chest Physicians, 2003). Oxygen saturation (SpO₂) was recorded by pulse oximetry (Model 9847, Nonin Medical, Inc., Minneapolis, MN). Mean drop in SpO₂ was computed as the individual drop in SpO₂ from baseline. Achievement of the exercise test was accepted when subjects fulfilled at least three of the following criteria: a plateau in VO₂ despite an increase in exercise intensity, a maximal HR above 90% of the predicted maximal theoretical HR (220 – age in year) (Ben Saad et al. 2009), a respiratory exchange ratio greater than 1.1, a blood lactate concentration higher than 8.0 mmol.L⁻¹ and the apparent exhaustion of the subject.

The adolescents were thoroughly familiarized with all testing equipment and procedures. Subjects were asked to rest the day before all testing and be well hydrated.

Laser Doppler Flowmetry combined with iontophoresis of ACh

Endothelium-dependent and independent vasodilatation of the forearm skin microcirculation was evaluated by iontophoresis and skin heating in combination with LDF (Debbabi et al. 2010) before and after a maximal test. A laser beam penetrates the skin and a fraction of the light is backscattered by moving blood cells and undergoes a frequency shift according to the Doppler principle, generating a signal proportional to tissue perfusion. Forearm skin blood

perfusion was measured by means of a LDF apparatus (Periflux PF5001, Perimed, Stockholm, Sweden). The skin temperature was monitored throughout and maintained at 32 °C by the same LDF heating probe. The basal perfusion index was measured during the first five minutes at rest, without infusion of ACh and without heating the skin (skin temperature = 32°C). Baseline skin blood perfusion was defined as the mean value recorded during a four minutes time period. In order to investigate the endothelium-dependent vasodilatation, iontophoresis of graduated doses of ACh, was undertaken. Iontophoresis is a noninvasive standard method of drug application that allows the local transfer of electrically charged substances across the skin by using a small electric current. The electrical potential difference actively causes ions in the solution to migrate according to their electrical charge. ACh (diluted at 2% solution) was used to fill the chamber of the electrode. We used a delivery current of 10 mA and administered three successive doses of acetylcholine for ten seconds with an interval of two minutes between each dose in order to achieve a plateau of the response following each delivery of ACh. Lastly, the laser probe was heated to 44°C for five minutes and we recorded the maximal response to local skin heating, i.e. the endothelium-independent maximal vasodilatation. In order to eliminate baseline variability, the maximum skin perfusion value following iontophoresis was expressed as maximum percent change from the baseline (Debbabi et al. 2010).

Perfusion index after the third dose of ACh iontophoresis was the maximal endothelial response (arbitrary unit). Maximum perfusion index after heat hyperemia and without ACh infusion (skin temperature = 44°C, arbitrary unit) (Mourad et al. 2008; Hodges GJ and

Sparks PA, 2013). Results are expressed as ACh-induced percentage changes in perfusion index *versus* basal values.

Drug

The following drug was used is the ACh chloride (Sigma-Aldrich, Switzerland). It was obtained from commercially available source, dissolved in deionized sterile water to 2% solutions before the start of the experimental protocol and kept on ice at -4°C.

Statistical Analysis

Variables distributions were normal and results are presented as mean \pm SD. Statistical analysis was performed using Student's *t* test for paired and unpaired data. Comparisons of variables were carried out by the software *SigmaStats 3.1* statistical package for windows. Comparisons between baseline and cumulative evaluation were made with a paired student's *t*-test. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$.

Comparisons of variable were carried out by the software *SigmaStzts 3.1* statistical package for windows.

Results

Subject characteristics

Table 1 summarizes the analysis of the baseline values of physical and clinical characteristics. Age, height, BMI, systolic and diastolic pressure were similar in the two groups. As expected, S group showed significantly higher values for body mass than T group ($p < 0.05$). The resting HR values and the $\dot{V}O_2$ peak was significantly higher in T group than S group ($p < 0.001$).

General characteristics of sedentary and trained subjects

Variable	Sedentary n = 20	Trained n = 29	<i>P value between groups S vs. T</i>
Age (years)	15 ± 1	15 ± 1	<i>Ns</i>
Height (cm)	178 ± 7	180 ± 7	<i>Ns</i>
Weight (kg)	74 ± 10	68 ± 7	< 0.05
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 2	21.8 ± 2	<i>Ns</i>
HR rest (bpm)	83.1 ± 10	72.2 ± 7	< 0.001
HR peak (bpm)	182.2 ± 10	185.51 ± 10	<i>Ns</i>
Resting systolic Blood Pressure (mm Hg)	120.38 ± 9	117.4 ± 5	<i>Ns</i>
Resting diastolic Blood Pressure (mm Hg)	80.4 ± 2	78.2 ± 4	<i>Ns</i>
$\dot{V}O_{2peak}$ (ml.min ⁻¹)	3.322 ± 0.652	3.78 ± 3.786	< 0.05
$\dot{V}O_{2peak}$ (ml.min ⁻¹ .kg ⁻¹)	40.05 ± 4.53	51.65 ± 5.76	< 0.001

Data are Average of values \pm SD. BMI: Body Mass Index; R. HR: Resting Heart Rate; HR peak: peak Heart Rate; $\dot{V}O_{2peak}$: peak of oxygen consumption; sedentary group vs. trained group. Ns: not significant.

Effects of iontophoresis delivery of ACh on FSBF

The iontophoresis delivery of ACh, increased FSBF in a dose-dependent manner was observed in the two groups. No difference in the FSBF response to iontophoresis delivery of ACh (expressed as percentage change from the baseline) registered during resting conditions between groups (**figure 1**).

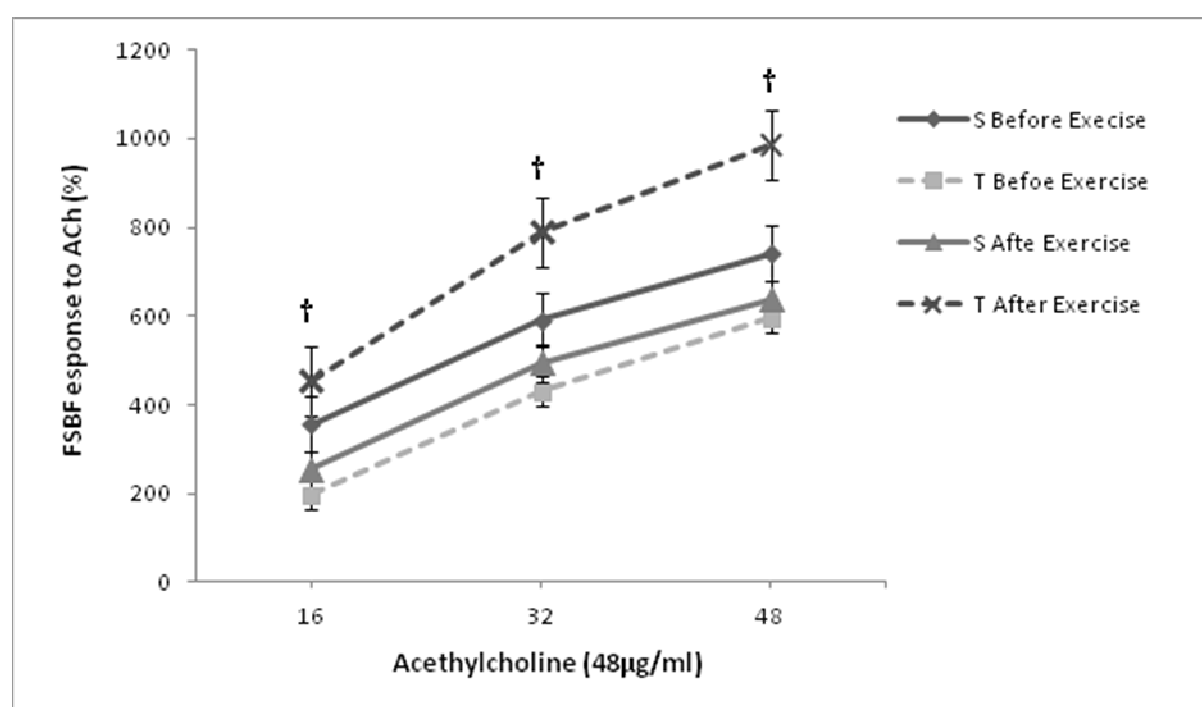


Figure 1: Cumulative concentration-response curves of Forearm Skin Blood Flow response to acetylcholine (expressed as percentage change from the baseline) observed before and after an acute exercise in sedentary and trained subjects. T = trained, S = sedentary. † = significantly different from sedentary group ($P < 0.001$).

These results indicate that skin infusion of ACh, increased FSBF in a dose-dependent manner in the two groups. The T group responds significantly higher than sedentary one after exercise ($P < 0.001$).

For the two groups, whatever before or after exercise, maximum response to the ACh-induced endothelium-dependent relaxation was observed in the 3th dose (48 μ g/ml) and was significantly higher than the other doses in T group ($p < 0.001$) (**figure 2**).

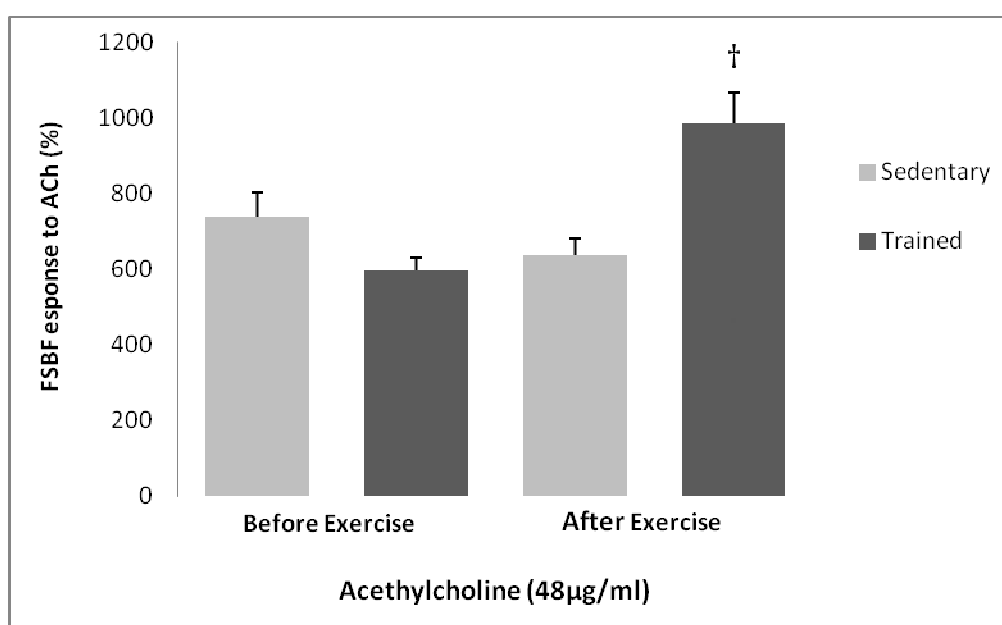


Figure 2. The Forearm Skin Blood Flow response to iontophoresis delivery of acetylcholine (expressed as percentage change from the baseline) observed before and after an acute exercise in sedentary and trained subjects. † = significantly different from sedentary group ($p < 0.001$).

Unlike the endothelium-dependent vasodilator ACh, which induced a significant impact on the FSBF of the T group after exercise, elevation of skin temperature at 44°C, an

endothelium-independent vasodilator, did not significantly affect the FSBF response of the groups, whatsoever before or after exercise, as shown in *figure 3*.

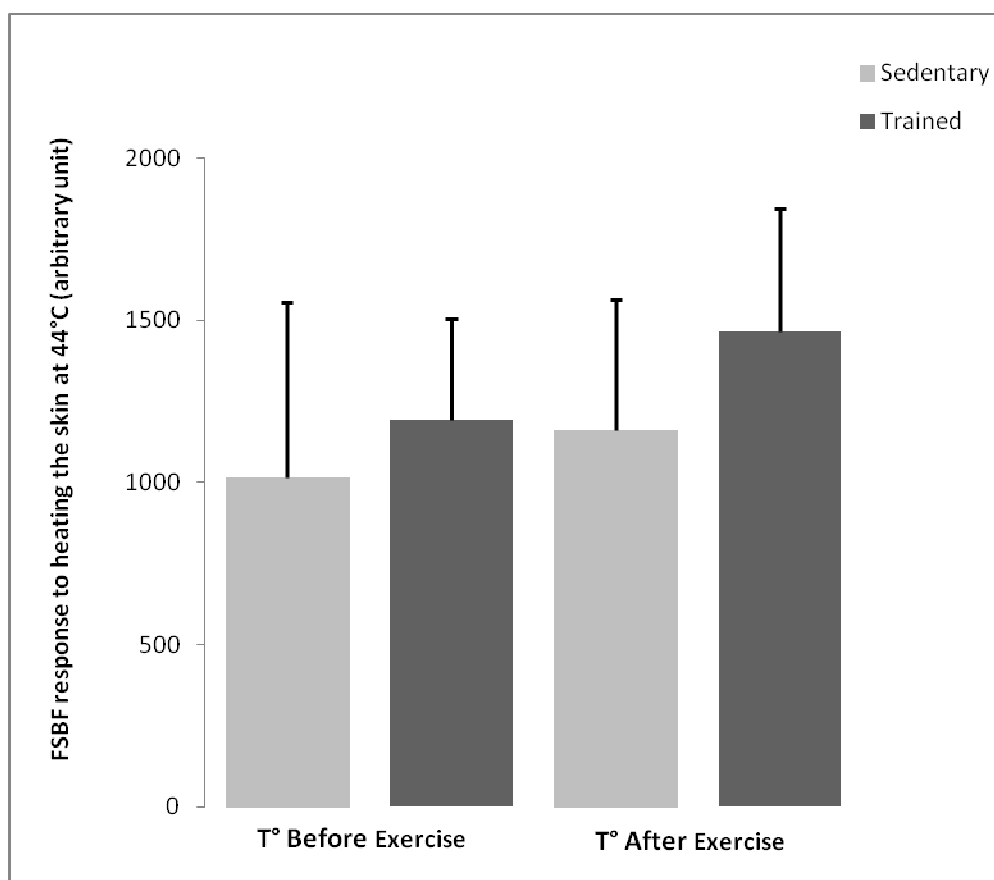


Figure 3, Forearm skin blood flow response to heating the skin at 44°C. Elevation of the skin temperature at 44°C, an endothelium-independent vasodilator, did not affect significantly the Forearm skin blood flow response of the groups.

Discussion

The present study, demonstrated that the FSBF response to ACh-induced endothelium-dependent relaxation was significantly increased on trained young subjects compared to control after a single acute exercise. So the null hypothesis, that there is no difference

between the FSBF data of the two groups is rejected. Present data show also that the training in healthy young men influences significantly the EDR by an increase of FSBF response.

Physical and clinical characteristics indicates that, in T group, lower values of body mass compared to S one, these differences was due to the regular training; indeed exercise training decrease fat mass (Conti AA and Macchi C, 2013). As expected, we observed, a significantly increase in $\dot{V}O_2$ peak and a significantly decrease in resting HR values, these results are in agreement with literature (Goto et al. 2003; Heylen et al. 2005). Therefore, CVD in adults are laid in childhood and accelerated by the presence of comorbid conditions such as sedentarity, uncontrolled alimentation, obesity and smoking (Short et al. 2009).

Laser Doppler Flowmetry

Clinical assessment of endothelial function is an insightful exploratory process by which one could detect the upstream events that may lead to the prevention of cardiovascular complication for subjects at high risk. In this context, pharmacological methods, which consist of evaluating the endothelium-mediated flow-(in)dependent dilation by LDF along with iontophoresis (Serne et al. 2002 ; Miaadi-Messaoud et al. 2010) have recently been used to report a significant transient increase of cutaneous blood flow signal in response to local infusion of vasoactive substances like ACh. This method has been tested on healthy subjects as well as on people with disease states affecting their endothelial reactivity (Rakobowchuk et al. 2005; Morris et al. 1995). As it provides a direct assessment of microvascular endothelial function, LDF is considered to be reliable non-invasive investigative technique for human clinical exploration. Moreover, the fact that the intra-subject measurements resulting from the

LDF are highly reproducible without the intervention of the investigator's subjectivity is a clear indication that this technique provides strict standardization of the recording site. (Kubli et al. 2000).

Dose-response curves were obtained by ACh iontophoresis. Other studies indicated that ACh-induced vasodilatation is not only dependent on the production of NO but also the action of prostaglandin in the skin vessels (Rubanyi et al. 1991)

Effects of iontophoresis delivery of ACh on FSBF

Before exercise

We evaluated vasoreactivity by comparing the changes in FSBF response to a cumulative concentration of ACh an endothelium-dependent vasodilator. Since the original data of Furchgott and zwadevski ,1980 who have explained the vadodilatator effects of ACh via NO releasing on healthy rabbit aorta, many others studies showed and confirm this finding (Saiag et al. 1996 ; Zguira et al. 2013). So our study joined these many studies who confirmed the changes in blood flow response with vasodilatator effects of ACh through two mechanisms, both of which are dependent on intact endothelium (Miaadi-Messaoud et al. 2010; Zguira et al. 2013). Our data showed an increase in the FSBF response in both S and T groups after an ACh iontophoresis at rest. In fact, it's well known that ACh directly binds muscarinic receptors on the endothelium and causes the NO liberation which diffuses to the media and induces relaxation of the vascular smooth muscle cells (Furchgott and zwadevski, 1980). The second mechanism is called Lewis triple-flare response, or nerve axon reflex-mediated vasodilatation, and is caused by the action of ACh on C-nociceptive fibers. ACh sensitizes the

C-nociceptive fibers and augments the release of substance-P and calcitonin gene-related peptide. This peptide directly causes vasodilatation (Brain et al. 2004), and substance-P induces a release of mast-cell histamine. This indirectly leads to vasodilatation and increased vascular permeability. So, this first result of our studied groups was in accordance with literature.

After exercise

The data obtained from the comparison of groups demonstrate that FSBF response to ACh-induced endothelium-dependent relaxation was significantly increased on trained young subjects compared to the sedentary one after a single acute exercise. This result was in agreement with other studies that showed beneficial effects of exercise training on endothelium-dependent vasodilation (Higashi et al. 1999; Goto et al. 2003). In this population, our data constituted original data because this study is the first who involves young people (15 ± 1 year).

Endothelium released NO in response to both endocrine mediators (eg, ACh and bradykinin) (Furchgott and Zawadzki, 1980; Cherry et al. 1982) and mechanical stimuli (eg, changes in blood flow velocity and endothelial shear stress) (Hambrecht et al. 1998). The fact that there are no differences between systolic and diastolic blood pressure and heart rate peak does not mean that the duration of submission to shear stress is the same in sedentary and trained when $\dot{V}O_{2\max}$ is reached. Indeed T takes longer than S to reach their $\dot{V}O_{2\max}$. Therefore, their resistance vessels are subjected during longer time to shear stress in T. thus, the effect of endothelium-dependent vasodilatation induced by the shear stress is more important in

trained. It is obviously noticed that exercise training provides direct beneficial effects to the vasculature which may contribute to decrease cardiovascular disease risk factors (Johnson et al. 2012). Although, there have been lots of evidence implying the beneficial effect of exercise on endothelial function. It's well known that exercise training induces increase in blood flow that causes vasodilation (Pyke et al. 2005). Many studies showed that exercise training improve endothelial function with a better NO release and/or biodisponibility, a decreased oxidant stress, an increased functional capacity of circulating angiogenic cells (Jenkins et al. 2009). Laufs et al. (2004) showed that exercise training improves endothelial function by increasing vasodilatory NO release and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activity in endothelial cells and they also noted that physical inactivity causes endothelial dysfunction in part through impairment of eNOS.

In conclusion, cutaneous microvascular endothelium-dependent vasodilatation data show that training of young subjects potentiates the vasodilators effects of ACh after an acute exercise compared to the sedentary subjects. The training in healthy young men influences significantly the EDR by an increase of FSBF response. It is necessary to pursue a better understanding of the mechanisms leading to a potentiation of the ACh-induced EDR in trained subjects submitted to acute exercise.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author's contributions

MSZ was responsible for the design conception of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, and drafting of the manuscript. HMM, HBS and HD were responsible of the collection of the data. BS has participated in interpretation of the data. ZT supervised the study and was responsible for the interpretation of the data. All authors have read and approved the final manuscript.

References

1. Ben Saad, H., Prefaut, C., Missaoui, R., Mohamed, IH., Tabka, Z., Hayot, M., 2009. Reference equation for 6-min walk distance in healthy North African children 6-16 years old. *Pediatr Pulmonol.* 44(4):316-24.
2. Brain, S.D., Grant, A.D., 2004. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev.* 84(3):903-34.
3. Cherry, P.D., Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., Jothianandan, D., 1982. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79(6):2106-10.
4. Conti, A.A. and Macchi, C., 2013. Protective effects of regular physical activity on human vascular system. *Clin Ter.* 164(4):293-4.
5. Dawson, E.A., Whyte, G.P., Black, M.A., Jones, H., Hopkins, N., Oxborough, D., Gaze, D., Shave, R.E., Wilson, M., George, K.P., Green, D.J., 2008. Changes in vascular and cardiac function after prolonged strenuous exercise in humans. *J Appl Physiol.* 105(5):1562-8.
6. Deanfield, J.E., Halcox, J.P., Rabelink, T.J., 2007. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 115:128–95

7. Debbabi, H., Bonnin, P., Ducluzeau, P.H., Lefthériotis, G., Levy, B.I., 2010. Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation. *Am J Hypertens.* 23(5):541-6
8. Elasmî, M., Fekî, M., Sanhaji, H., Jemaa, R., Haj Taeib, S., Omar, S., Mebazaa, A., El Ati, J., Hsairi, M., Kaabachi, N., 2009. Prevalence of conventional cardiovascular risk factors in the Great Tunis population. *Rev Epidemiol Sante Publique.* 57(2):87-92.
9. Fritzsche, R.G. and Coyle, E.F., 2000. Cutaneous blood flow during exercise is higher in endurance-trained humans. *J Appl Physiol.* 88(2):738-44.
10. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V., 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373–6.
11. Goto, C., Higashi, Y., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Nakagawa, K., Kawamura, M., Chayama, K., Yoshizumi, M., Nara, I., 2003. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation.* 108(5):530-5.
12. Hambrecht, R., Fiehn, E., Weigl, C., Gielen, S., Hamann, C., Kaiser, R., Yu, J., Adams, V., Niebauer, J., Schuler, G., 1998. Regular physical exercise corrects endothelial dysfunction and improves exercise capacity in patients with chronic heart failure. *Circulation.* 98(24):2709-15.

13. Haram, P.M., Adams, V., Kemi, O.J., Brubbakk, A.O., Hambrecht, R., Ellingsen, O., 2006. Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 13:585–91.
14. Heylen, E., Simon, B., Guerrero, F., Elkaïm, J.P., Saïag, B., Mansourati, J., 2005. Reactive hyperaemia in the forearm skin of highly trained windsurfers. *Int J Sports Med.* 26, 822-6
15. Heylen, E., Guerrero, F., Mansourati, J., Theron, M., Thibou, S., Saïag, B., 2008. Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rat. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 15, 52–8.
16. Higashi, Y., Sasaki, S., Sasaki, N., Nakagawa, K., Ueda, T., Yoshimizu, A., Kurisu, S., Matsuura, H., Kakiyama, G., Oshima, T., 1999. Daily aerobic exercise improves reactive hyperemia in patients with essential hypertension. *Hypertension.* 33, 591-7.
17. Hodges, G.J., Sparks, P.A., 2013. Contribution of endothelial nitric oxide synthase, noradrenaline, and neuropeptide Y to local warming-induced cutaneous vasodilatation in men. *Microvascular Res.* 90, 128-134.
18. Jamoussi, H., Mahjoub, F., Sallemi, H., Berriche, O., Ounaissa, K., Amrouche, C., Blouza, S., 2012. Metabolic syndrome in Tunisian obese children and adolescents. *Tunis Med.* 90, 36-40.

19. Jenkins, N.T., Witkowski, S., Spangenburg, E.E., Hagberg, J.M., 2009. Effects of acute and chronic endurance exercise on intracellular nitric oxide in putative endothelial progenitor cells: role of NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297, 1798-805.
20. Johnson, B.D., Mather, K.J., Wallace, J.P., 2011. Mechanotransduction of shear in the endothelium: basic studies and clinical implications. *Vasc Med.* 16, 365-77.
21. Johnson, B.D., Mather, K.J., Newcomer, S.C., Mickleborough, T.D., Wallace, J.P., 2012. Brachial artery flow-mediated dilation following exercise with augmented oscillatory and retrograde shear rate. *Cardiovasc Ultrasound.* 11,10-34
22. Kingwell, B.A., Berry, K.L., Cameron, J.D., Jennings, G.L., Dart, A.M., 1997. Arterial compliance increases after moderate-intensity cycling. *Am J Physiol.* 273, 2186-91.
23. Kubli, S., Waeber, B., Dalle-Ave, A., Feihl, F., 2000. Reproducibility of laser Doppler imaging of skin blood flow as a tool to assess endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 36, 640-8.
24. Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Mische, E., Böhm, M., Nickenig, G., 2004. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation.* 109, 220-6.

25. Maiorana, A., O'Driscoll, G., Dembo, L., Goodman, C., Taylor, R., Green, D., 2001. Exercise training, vascular function, and functional capacity in middle-aged subjects. *Med Sci Sports Exerc*, 33, 2022–8.
26. Miâdi-Messaoud, H., Chouchane, A., Abderrazek, E., Debbabi, H., Zaouali-Ajina, M., Tabka, Z., Ben-Jebria, A., 2010. Obesity-induced impairment of endothelium-dependent vasodilation in Tunisian women. *Int J Obes (Lond)*. 34, 273-9.
27. Morris, S.J., Shore, A.C., Tooke, J.E., 1995. Responses of the skin microcirculation to acetylcholine and sodium nitroprusside in patients with NIDDM. *Diabetologia*. 38, 1337-44.
28. Mourad, J.J., Danchin, N., Puel, J., Gallois, H., Msihid, J., Safar, M.E., Tanaka, H., 2008. Cardiovascular impact of exercise and drug therapy in older hypertensives with coronary heart disease: PREHACOR study. *Heart Vessels*. 23, 20-5.
29. Pyke, K.E., Tschakovsky, M.E., 2005. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol*. 568, 357-69.
30. Rakobowchuk, M., McGowan, C.L., De Groot, P.C., Hartman, J.W., Phillips, S.M., MacDonald, M.J., 2005. Endothelial function of young healthy males following whole body resistance training. *J Appl Physiol*. 98, 2185-90.
31. Roche, D.M., Rowland, T.W., Garrard, M., Marwood, S., Unnithan, V.B., 2010. Skin microvascular reactivity in trained adolescents. *Eur J Appl Physiol*. 108, 1201-8.

32. Rognmo, O., Bjørnstad, T.H., Kahrs, C., Tjønnå, A.E., Bye, A., Haram, P.M., Stølen, T., Slørdahl, S.A., Wisløff, U., 2008. Endothelial function in highly endurance-trained men: effects of acute exercise. *J Strength Cond Res.* 22, 535-42.
33. Rubanyi, G.M., 1991. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem.* 46,27-36.
34. Saiag, B., Hillaire-Buys, D., Chapal, J., Petit, P., Pape, D., Rault, B., Allain, H., Loubatières-Mariani, M.M., 1996. Study of the mechanisms involved in adenosine-5'-O-2(2-thiodiphosphate induced relaxation of rat thoracic aorta and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol.* 118, 804–10.
35. Serné, E.H., IJzerman, R.G., Gans, R.O., Nijveldt, R., De Vries, G., Evertz, R., Donker, A.J., Stehouwer, C.D., 2002. Direct evidence for insulin-induced capillary recruitment in skin of healthy subjects during physiological hyperinsulinemia. *Diabetes.* 51, 1515-22.
36. Short, K.R., Blackett, P.R., Gardner, A.W., Copeland, K.C., 2009. Vascular health in children and adolescents: effects of obesity and diabetes. *Vasc Health Risk Manag.* 5, 973-90.
37. Suresh, K., Chandrashekara, S., 2012. Sample size estimation and power analysis for clinical research studies. *J Hum Reprod Sci.* 5, 7-13.
38. Tanner, J.M., Whitehouse, R.H., 1962. Standards for subcutaneous fat in British children. Percentiles for thickness of skinfolds over triceps and below scapula. *Br Med J.* 1, 446-50.

-
39. Thompson, M.A., Henderson, K.K., Woodman, C.R., Turk, J.R., Rush, J.W., Price, E., Laughlin, M.H., 2004. Exercise preserves endothelium-dependent relaxation in coronary arteries of hypercholesterolemic male pigs. *J Appl Physiol.* 96, 1114-26.
40. Westerman, R.A., Widdop, R.E., Hannaford, J., Low, A., Roberts, R.G., Kent, P., 1988. Laser Doppler velocimetry in the measurement of neurovascular function. *Australas Phys Eng Sci Med.* 11, 53-66.
41. Woodman, C.R., Turk, J.R., Rush, J.W., Laughlin, M.H., 2004. Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs. *J Appl Physiol.* 96, 1105-13.
42. Woodman, C.R., Ingram, D., Bonagura, J., Laughlin, M.H., 2006. Exercise training improves femoral artery blood flow responses to endothelium-dependent dilators in hypercholesterolemic pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290, 2362-8.
43. Zguira, M.S., Vincent, S., Le Douairon-Lahaye, S., Malarde, L., Tabka, Z., Saïag, B., 2013. Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta. *Cardiovasc Diabetol.* 11,12:32

ARTICLE 3

TROISIEME PARTIE

Etude 3 : Effet d'un programme d'entraînement physique de deux mois sur la fonction endothéliale et sur le statut inflammatoire chez les femmes obèses en Tunisie.

Résumé

L'obésité constitue un problème non seulement de santé mais aussi financier. La physiopathologie de l'obésité est très complexe. Il s'agit d'une maladie multifactorielle. Le rôle des facteurs environnementaux explique l'augmentation de sa prévalence ces dernières décennies. Le comportement sédentaire apparaît comme un déterminant de l'augmentation de l'incidence de l'obésité ainsi que le mode alimentaire. Ainsi, l'obésité s'associe à de nombreux facteurs de risques, cardiovasculaires, respiratoires (syndrome d'apnées hypopnées obstructives du sommeil et syndrome d'hypoventilation alvéolaire de l'obèse), ostéo-articulaires et métaboliques (diabète de type II, hyper-uricémie, insulino-résistance,...). Les anomalies de la fonction endothéliale chez l'obèse ainsi que les perturbations engendrées par le statut proinflammatoire de l'obèse constituent une découverte récente. A notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à évaluer l'effet de l'entraînement physique sur ces paramètres chez la femme obèse. Ces arguments justifient notre démarche dont l'objectif est d'analyser l'effet d'un programme d'exercice musculaire individualisé de deux mois chez les femmes obèses, sur la fonction endothéliale et sur les biomarqueurs de l'inflammation. 30 femmes obèses âgées de 20 à 40 ans dont l'indice moyen de masse corporel (IMC) est de $38.5 \pm 0.6 \text{ Kg.m}^{-2}$ ont été incluses dans l'étude avec 32 femmes témoins (IMC de $23.7 \pm 1.2 \text{ Kg.m}^{-2}$). Un examen clinique et des mesures biologiques ont été effectués. Un test de marche de six minutes est réalisé ainsi qu'une mesure de la fonction endothéliale par doppler laser couplé à l'iontophorèse d'acétylcholine pour estimer la vasodilatation endothélium dépendante. L'entraînement est réalisé à une fréquence cardiaque cible comprise entre 50 et 60% de la fréquence cardiaque mesurée à la fin du test de marche de six minutes. L'entraînement comporte trois séances par semaine ; d'une heure chacune pendant deux mois. Toutes les mesures sont refaites après deux mois d'entraînement. Les résultats indiquent une augmentation de la distance de marche moyenne de 45 mètres chez les obèses alors que chez les témoins l'augmentation est de 118 mètres. Il existe une franche perturbation du profil inflammatoire avec des concentrations respectives de TNF alpha $6.2 \pm 0.4 \text{ pg/ml}$, la leptine $15.6 \pm 0.9 \text{ pg/ml}$, Interleukine $3.7 \pm 0.5 \text{ pg/ml}$, la visfatine $37.2 \pm 1.2 \text{ pg/ml}$. Ces valeurs sont significativement plus élevées par rapport aux témoins. L'entraînement réduit significativement le TNF alpha de 6.4%, la leptine de 10%, l'interleukine 6 de 43% et la visfatine de 46%. Il existe aussi une altération de la fonction endothéliale avec des valeurs respectives $323 \pm 18\%$ chez les obèses alors que chez les témoins la perfusion est de $1167 \pm 11\%$. L'entraînement améliore de manière révélatrice l'aptitude aérobie, la distance de marche de six minutes dont l'augmentation est respectivement de 11% chez les femmes obèses et chez les témoins de 19%. La fonction endothéliale est clairement augmentée dans les deux groupes, mais les femmes obèses bénéficient beaucoup plus de l'entraînement que les témoins avec une croissance de 156%. Néanmoins, les témoins ont amélioré leur perfusion de 27%. L'exercice musculaire conduit sous forme d'un entraînement individualisé, restaure les capacités aérobies et la fonction endothéliale et induit une régression de l'inflammation comme en témoigne la réduction significative des biomarqueurs de l'inflammation.

Mots clés : obésité, fonction endothéliale, biomarqueurs de l'inflammation, exercice physique individualisé

1. INTRODUCTION

L'urbanisation excessive, la société moderne, le mode de vie sédentarisé, la facilité de l'exécution des tâches quotidiennes et la quantité élevée d'aliments hypercaloriques ont abouti à des changements des habitudes alimentaires et des styles de vie qui font le lit de l'obésité (1). Cette dernière est définie comme étant un excès de poids dû à une inflation des réserves énergétiques avec un excès de masse grasse. L'augmentation des réserves adipeuses est pathologique lorsqu'elle est exposée au risque accru de mortalité et de morbidité ainsi que par l'altération de la situation psychosociale ou de la qualité de vie de l'individu (2).

L'obésité est une maladie chronique, à potentiel évolutif conduisant à une pathologie d'organe et qui concerne plus d'un milliard de personnes dans le monde entier (3, 4). Selon la publication de l'OMS en mars 2013 (5), À l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. Le surpoids concerne 1,4 milliard de personnes de 20 ans et plus, parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près 300 millions de femmes sont obèses (estimations de 2008). 35% des adultes âgés de 20 ans et plus étaient en surpoids et 11% étaient obèses (estimations de 2008). 65% de la population mondiale habitent dans des pays où le surpoids et l'obésité tuent plus de gens que l'insuffisance pondérale. Le surpoids concerne près de 40 millions d'enfants de moins de cinq ans (estimations de 2011).

Dans ce contexte, la Tunisie semble se situer à un stade avancé : selon les enquêtes budget consommation et niveau de vie des ménages (EBCNVM), la prévalence de l'obésité est élevée, notamment chez les femmes, et a fortement évolué au cours des deux dernières décennies en passant de 8,7 % en 1980 à 17,4 % en 1995 (6, 7). En 1996/97, l'Enquête

Nationale de Nutrition a révélé une prévalence de 22,7 % chez les femmes, ce qui confirme cette tendance (7).

Plus alarmante encore est la mise en évidence récente d'anomalies de la fonction endothéliale chez les obèses démontrant que l'obésité est un véritable marqueur de risque de la survenue d'accidents cardiovasculaires (8).

L'expression dysfonction endothéliale est un terme qui fait référence à une perte des fonctions régulatrices normales de l'endothélium vasculaire et qui peut survenir assez tôt dans le processus de développement de certaines pathologies. Elle est à l'origine d'un phénotype pro-inflammatoire et pro-thrombotique qui peut jouer un rôle crucial et précoce dans la physiopathologie des maladies cardiovasculaires (9, 10).

De plus, l'excès de la masse grasse est associé à une élévation modérée des taux circulants de médiateurs inflammatoires non spécifiques d'interleukines et de cytokines (C-Réactive Protéine, cytokines, interleukines, molécules d'adhésion ou de remodelage de la matrice extracellulaire), produits par le foie et les organes lymphoïdes mais également par le tissu adipeux blanc. Il s'agit de protéines de la phase aiguë de l'inflammation (11). Comme les autres tissus de l'organisme, le tissu adipeux possède des macrophages « résidents » dont la fonction n'est pas clairement établie, mais qui semble avoir une action anti-inflammatoire (phénotype M2, produisant des cytokines anti-inflammatoire comme l'IL-10).

La réduction pondérale assure une amélioration de l'état inflammatoire observé dans l'obésité et une chute de l'expression des gènes de l'inflammation du tissu adipeux (12). En fait, de nombreuses études ont prescrit la pratique d'une activité physique dans les programmes de

lutte et de prévention contre cette pathologie (13, 14, 15, 16, 17, 18). De même, il a été démontré qu'une meilleure utilisation périphérique du glucose pourrait prévenir l'obésité, ce qui plaide en faveur du rôle pivotant d'une activité physique régulière (19).

L'entraînement combiné avec un programme de régime hypocalorique a amélioré la capacité à oxyder les lipides pendant l'exercice. Cette amélioration a été associée aux améliorations des concentrations plasmatiques des adipocytokines chez des adolescentes obèses (17, 18)

De cette problématique émane l'hypothèse que l'entraînement physique individualisé améliorerait significativement l'aptitude aérobie, la distance de marche de six minutes, la fonction endothéliale et réduirait significativement les biomarqueurs de l'inflammation chez les femmes obèses.

A notre connaissance, peu ou pas d'études se sont intéressées à la fois à l'effet d'un réentraînement individualisé par l'exercice musculaire sur la fonction endothéliale mesurée par la technique du doppler laser couplée à l'iontophorèse de l'acétylcholine, à l'aptitude aérobie et aux biomarqueurs de l'inflammation chez les femmes Tunisiennes obèses. Ainsi, l'objectif général de ce travail est d'analyser l'effet d'un programme de réhabilitation par un entraînement physique individualisé, chez les femmes obèses, sur l'aptitude aérobie, l'état inflammatoire et la fonction endothéliale.

2. METHODOLOGIE

2.1. Echantillon étudié

Notre étude a été réalisée sur un échantillon composé de 62 sujets de sexes féminins (30 obèses et 32 témoins) recrutés de façon aléatoire et regroupés selon leurs indices de masse corporelle (IMC).

L'âge moyen des deux groupes témoins et obèses est respectivement de $32 \pm 1,6$; $33 \pm 1,2$ ans.

Les moyennes d'IMC correspondantes sont respectivement de 23.7 ± 1.2 et 38.5 ± 0.6 Kg/m².

Les critères d'inclusions et de non inclusions ont été respectés pour toutes les participantes.

En effet, les femmes doivent être non fumeuses et indemnes de toutes pathologies respiratoires et ne pratiquent aucune activité physique. Toutes les femmes recrutées ont signé un consentement pour la participation. Le choix du sexe féminin repose sur le fait que d'une part la fréquence de l'obésité chez les femmes est plus importante que chez les hommes en Tunisie. Et d'autre part, la majorité des hommes sont soit des fumeurs soit exposés au tabagisme passif.

2.2. Procédure Expérimentale

Un questionnaire a été élaboré pour obtenir les informations sur l'état de santé de chaque femme (antécédents familiaux, personnels, tabagisme, condition de vie....). L'examen clinique a permis de mesurer les données anthropométriques (âge, poids, taille) et la pression artérielle. L'Indice de masse corporelle (IMC) a été calculé.

Un prélèvement sanguin veineux a été réalisé sur des tubes secs après une période de jeûne de 12 heures. Les dosages suivants sont effectués : glycémie, cholestérol total, triglycérides, LDL, HDL. Nous avons aussi mesuré les bio-marqueurs de l'inflammation suivants : TNF alpha, Interleukine 6, Leptine, Visfative. (Méthode ELISA).

Les cytokines inflammatoires et hormones

Les concentrations plasmatiques de visfatine, du TNF alpha, l'interleukine-6 et la leptine ont été déterminées par la technique ELISA-kits de RayBiotech

Evaluation de la fonction endothéliale : Laser Doppler couplée à l'iontophorèse d'acétylcholine

La vasodilatation endothélium-dépendante de la microcirculation cutanée est évaluée par la combinaison de l'iontophorèse et de la débimétrie par Laser Doppler. Un faisceau laser pénètre à travers la peau et une fraction de la lumière est réfléchiée en percutant les globules rouges en mouvement dans la microcirculation cutanée avec modification de la fréquence selon le principe du Doppler. Les mouvements de fréquence sont convertis en un signal électrique (20), exprimé en unités arbitraires, proportionnel au nombre et à la vitesse des globules rouges, donc proportionnel à la perfusion cutanée (21).

Le matériel utilisé est illustré par des photographies, il est composé de :

Un appareil laser Doppler : caractérisé par une longueur d'onde de l'ordre de 780nm et une fréquence de l'ordre de 32Hz. Il est équipé d'une sonde Laser Doppler liée à l'appareil par le biais de deux fibres optiques.

Un générateur de courant (PF 382 b, Perimed AB, Periont Supply, Jarfalla, STOCKHOLM, Suède) : Ce générateur consiste en une batterie (9 volt) qui présente deux boutons de réglage, un pour le réglage de l'intensité du courant électrique et l'autre pour le réglage du temps. A ce générateur sont branchées une anode et une cathode.

Des Électrodes de référence (PF 384 b, Perimed, Jarfalla, suède) : C'est une électrode double face dont l'une est autocollante qui sera mise en contact avec la peau, alors que l'autre face sera en contact avec la cathode.

Des électrodes double face autocollantes ou électrode Laser Doppler : La première face permet de fixer la sonde à la zone de mesure, alors que la 2ème face est centrée par un chiffon sous forme d'un disque qui sera le support de la substance administrée. Cette électrode sera fixée à l'anode de la batterie.

Un ordinateur équipé d'un logiciel Perisoft pour Windows System(PSW) : Ce logiciel est actuellement utilisé en clinique courante et dans le domaine de la recherche. Il permet d'enregistrer tous les signaux détectés par le Doppler Laser.

L'Acétylcholine : L'ACh utilisée est une solution préparée à 2% avec l'eau désionisée, soit 20g/L. La quantité de l'ACh déposée sur l'électrode double face est estimée à 80 microlitres.

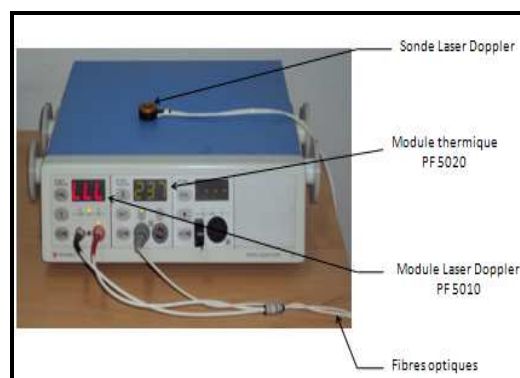


Figure 1. Photographie de l'appareil Doppler laser utilisé dans notre étude (Periflux PF 5001 Perimed, Jarfalla, Suède)

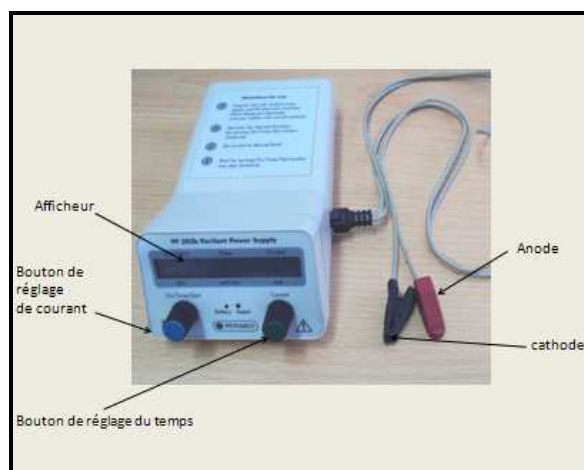


Figure 2. Photographie du générateur de courant utilisé dans notre étude (PF 382 b Perimed AB, Periont Supply, Jarfalla, STOCKHOLM, Suede)



Figure 3. Electrode de référence (PF 384 b Perimed, Jarfalla, Suède)

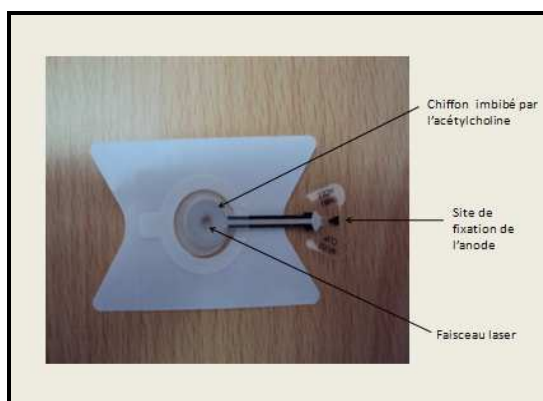


Figure 4. Electrode Doppler Laser (PF383, Perimed, Jarfalla, Suède)

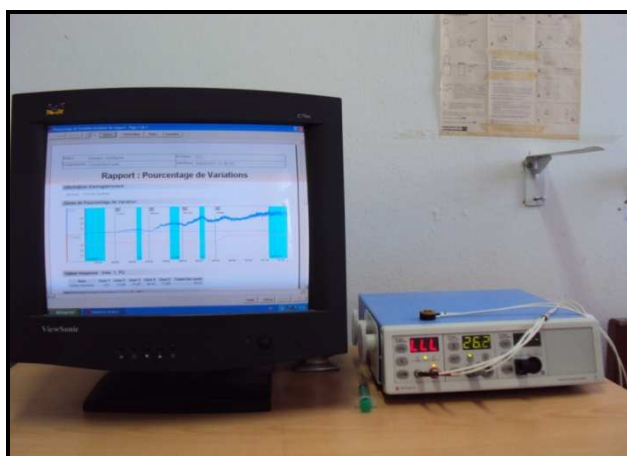


Figure 5. Ordinateur lié au Laser Doppler équipé d'un logiciel Perisoft for Windows System

Le test est réalisé le matin (9h-11h) dans une pièce avec une température contrôlée à 24°C-25°C. Après une période d'acclimatation on démarre l'examen, le sujet doit être à jeun. Deux électrodes sont déposées sur la peau de la face antérieure de l'avant-bras, une électrode contenant la chambre dans laquelle est déposée l'acétylcholine et une deuxième électrode conductrice à base d'hydrogel qui sert d'électrode de référence. La sonde Doppler est fixée sur l'électrode délivrant le produit. Une batterie est utilisée pour créer un courant électrique

entre les deux électrodes. Les différents protocoles utilisent l'acétylcholine comme substance vasodilatatrice endothélium-dépendante. L'acétylcholine délivrée par voie transcutanée par iontophorèse entraîne une vasodilatation microcirculatoire locale dose-dépendante (22). En effet, l'utilisation de l'acétylcholine semble être plus appropriée que l'hyperhémie post-occlusive pour provoquer des réponses vasodilatatrices endothélium-dépendantes. L'intensité du courant est de 10mA et permet l'administration de 3 doses croissantes d'acétylcholine (16, 32 et 48 µg/ml) pendant 10 secondes avec un intervalle de deux minutes entre les doses. Pour éviter les problèmes liés à la thermorégulation, la température de la sonde laser est maintenue constante à 33°C. Le signal Laser Doppler est enregistré sans interruption à l'aide d'un ordinateur. Après 2 minutes pendant lesquels on enregistre le signal à l'état de base (perfusion cutanée au repos), trois doses successives d'acétylcholine (séparées de 2 minutes l'une de l'autre) sont administrées. La vasodilatation microcirculatoire cutanée endothélium-dépendante a été définie comme le pourcentage d'augmentation de la perfusion locale, en rapportant le signal maximal atteint après chaque dose d'acétylcholine à la perfusion moyenne à l'état de base. Pour évaluer la capacité maximale de la vasodilatation de la microcirculation cutanée, (y compris la vasodilatation endothélium dépendante et non endothélium dépendante), la chaleur locale a été utilisée (vasoplégie thermo-dépendante). La peau a été chauffée à 44°C pendant 5 minutes grâce à la sonde Laser Doppler qui est combinée à un module chauffant. La capacité vasodilatatrice maximale a été définie comme le pourcentage de variation du signal Laser Doppler après chauffage par rapport au signal moyen à l'état de base.

Test de marche de six-minute (TM6)

Il consiste à demander à la femme de parcourir la plus longue distance pendant six minutes le long d'un couloir de 40 mètres étalonné tous les mètres. Il s'agit d'une marche rapide à pas identique, le sujet ne doit pas courir. On mesure la pression artérielle (PA), la saturation en oxygène transcutanée (oxymètre nonin) et la fréquence cardiaque au repos (cardifréquencemètre Poalr, Finland) ainsi que l'évaluation de la dyspnée sur l'échelle visuelle analogique. Après le signal du départ, la patiente marche et peut s'arrêter et repartir ensuite. Le chronomètre continue à mesurer le temps. A la fin du test on mesure la PA, la saturation, la fréquence cardiaque et on évalue la dyspnée. La distance de marche est évaluée en mètre près. La fréquence cardiaque atteinte à la fin du test est comparée à la fréquence cardiaque maximale théorique. Ce test permet de prédire la fréquence cardiaque cible qui sera atteinte lors de l'entraînement. Cette fréquence cible est de 55 à 65% de la fréquence cardiaque maximale mesurée lors du test de marche de six minutes. Chaque femme doit réaliser un exercice à une puissance qui permet d'atteindre et de maintenir la fréquence cardiaque cible lors du protocole d'entraînement.

Le programme de réentraînement

30 femmes obèses et 32 témoins ont suivi un programme personnalisé pendant 2 mois à raison de 3 séances par semaine sous la surveillance d'un enseignant d'éducation physique et d'un médecin.

Le programme est un cours collectif de vélo. C'est un travail d'endurance de capacité avec contrôle de la fréquence cardiaque (ne pas dépasser la fréquence cardiaque cible estimée lors du test de marche de six minutes réalisé avant le réentraînement).

Après un échauffement de 10 minutes conduit sous forme d'étirement pour assurer un réveil musculaire et de mouvements impliquant toutes les articulations, l'exercice est effectué sur bicyclette ergométrique à une puissance individualisée identifiée par le maintien de la fréquence cardiaque cible. La puissance du vélo est augmentée progressivement jusqu'à l'atteinte de la fréquence cardiaque cible mesurée en continu par un cardiofréquencemètre (Polar 4000, Finlande). La durée de l'exercice est de 30 minutes. Une période de récupération active puis passive associée à un renforcement musculaire est effectuée pendant 20 minutes. La durée totale de la séance est de 60 minutes.

3. RESULTATS

Le **tableau 1** représente les moyennes et les écarts types des données anthropométriques et du bilan sanguin avant et après l'entraînement chez les 2 groupes

3.1. Les données anthropométriques et biochimiques

Tableau 1. Variations des données anthropométriques et biochimiques avant et après entraînement

	<i>Obèses</i>		<i>Témoins</i>		
	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>P</i>
	<i>entraînement</i>	<i>entraînement</i>	<i>entraînement</i>	<i>entraînement</i>	
<i>Age (ans)</i>	33±1,2	-	32 ±1,06	-	<0,05
<i>Taille (m)</i>	1.65±0.05	-	1.59±1.08	-	<0,05
<i>Poids (Kg)</i>	105±3	95±2*	60±0.9	58±1	<0,05
<i>IMC (Kg.m⁻²)</i>	38,5±0,6	36,8±1,3*	23,7 ±1,2	22,5±0.8	<0,05
<i>PAS (mmHg)</i>	130±1	110±1*	108±1	107±1	<0,05
<i>PAD (mmHg)</i>	75±1	75±0,5	67,0±1,2	68,0±1,2	NS
<i>Glycémie (mmol/dl)</i>	5,92±0,14	5,46±0,47*	4,84 ±0,02	4,61 ±0,02§	<0,05
<i>Cholestérol total (mmol/l)</i>	4,53±0,18	4,36±0,45*	3,42 ±0,11	3.32±0.2	<0,05
<i>HDL cholestérol (mmol/l)</i>	0,98±0,12	1,12±0,04	1,05±0,03*	1,04±0.4	<0,05
<i>LDL cholestérol (mmol/l)</i>	2,91±0,15	2,69±0,13*	2,04±0,08	2,01±0,05	<0,05
<i>Triglycérides (mmol/l)</i>	1,28±0,23	1,03±0,02*	2,04±0,08§	1,94±0,03§	<0,05

Abréviations : IMC, Indice de masse corporelle ; PAS, pression artérielle systolique; PAD, pression artérielle diastolique ; HDL, lipoprotéine à haute densité ; LDL, lipoprotéine à basse densité.

p : significativité avant entraînement vs après entraînement. NS, non significatif

Différence significative entre les obèses avant et après l'entraînement (*p < 0.05)

Différence significative entre les témoins avant et après l'entraînement (§p<0.05)

On a constaté une diminution statistiquement significative après l'entraînement chez les femmes obèses selon des paramètres suivants : poids, IMC, PAS, glycémie, cholestérol, LDL et les triglycérides. Cependant, on a remarqué une augmentation du taux de HDL

Il n'existe pas de changement pour la PAD.

3.2. Les cytokines inflammatoires

Le **tableau 2** indique la variation des cytokines inflammatoires TNF- α , IL-6, Visfatine et Leptine, avant et après entraînement, § : p<0,05

Tableau 2 : Effet de l'entraînement sur les cytokines inflammatoires chez les 2 groupes

	Obèses		Témoins		P
	Avant entraînement	Après entraînement	Avant Entraînement	Après entraînement	
TNF-α (pg/ml)	6,2 \pm 0,4	5,8 \pm 0,3*	2,20 \pm 0,68	2,11 \pm 0,56	<0,05
IL-6(pg/ml)	3,7 \pm 0,5	2,1 \pm 0,3*	1,35 \pm 0,18	1,24 \pm 0,17§	<0,05
Visfatine(pg/ml)	37,2 \pm 1,2	19.8 \pm 0,4*	17,5 \pm 0,9	17,1 \pm 0,8	<0,05
Leptine (pg/ml)	15,6 \pm 0,9	13,89 \pm 0,5*	10,69 \pm 0,41	9,95 \pm 0,25§	<0,05

Différence significative entre les obèses avant et après l'entraînement (* $p < 0.05$)

Différence significative entre les témoins avant et après l'entraînement (§ $p < 0.05$)

Une baisse significative exprimée en pourcentage des valeurs après l'entraînement est constaté respectivement chez les obèses pour le TNF- α de 6,45%, pour les IL-6 de 43,24%, pour la visfatine de 46,77% et la leptine de 10,96%

Pour les témoins, cette baisse est respectivement de 4% pour le TNF- α , 8% pour les IL-6, 25% pour la visfatine et 6% pour la leptine.

3.3. La fonction endothéliale

L'analyse de la fonction endothéliale est schématisée avant l'entraînement par la figure 6 dans les deux groupes.

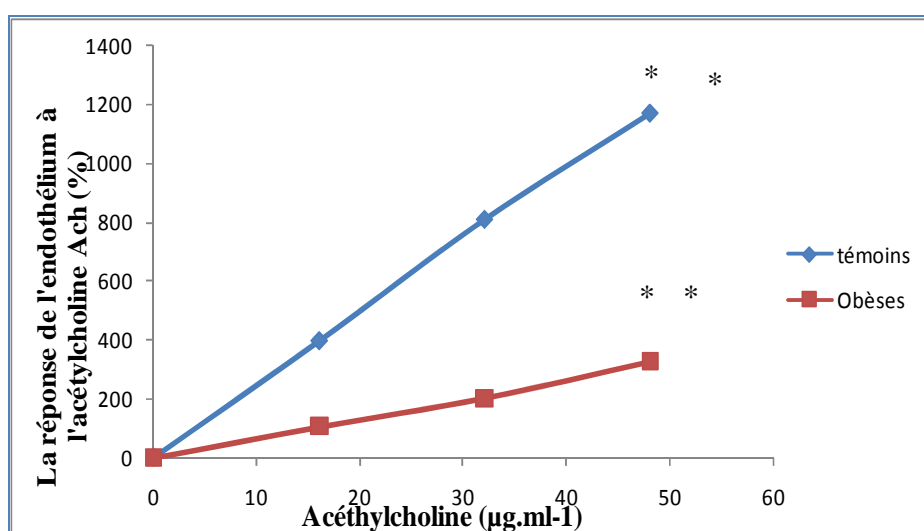


Figure 6. Variation de la réponse de l'endothélium à l'acétylcholine Ach (%) après administration des 3 doses d'ACH chez les 2 groupes avant l'entraînement.

Il existe une différence significative (* $p<0,05$) entre les deux groupes avec une réponse réduite chez les obèses par rapport aux témoins.

Cette même analyse de la fonction endothéliale est effectuée après les deux mois d'entraînement.

Les résultats sont explicités par la figure 7.

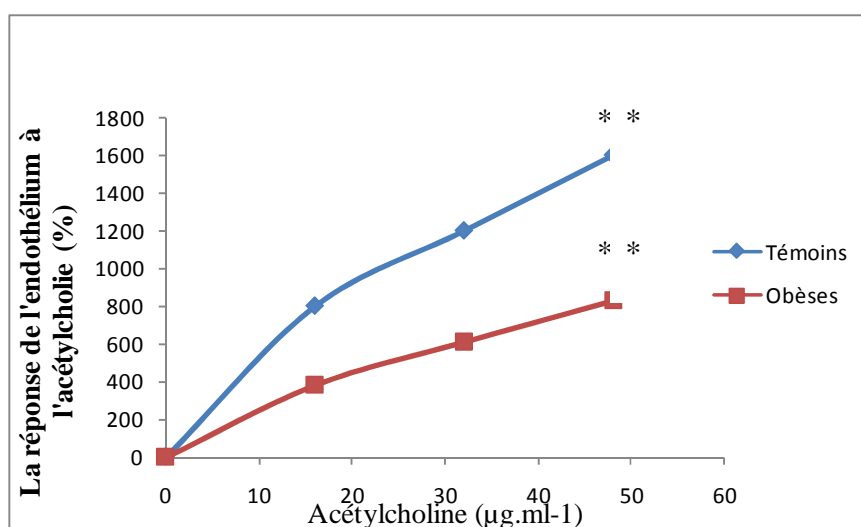


Figure 7. Variation de la réponse de l'endothélium à l'acétylcholine Ach (%) chez les 2 groupes après l'entraînement.

Nous avons comparé les pourcentages de variation induite par l'exercice dans les deux groupes à la troisième dose d'acétylcholine. On a constaté que les témoins ont augmenté leur débit de perfusion de 27%, alors que les obèses ont augmenté de 156% (* $p<0,05$)

Pour évaluer la capacité maximale de la vasodilatation de la microcirculation cutanée, nous avons obtenu les résultats avant l'entraînement, comme l'illustre la figure 8

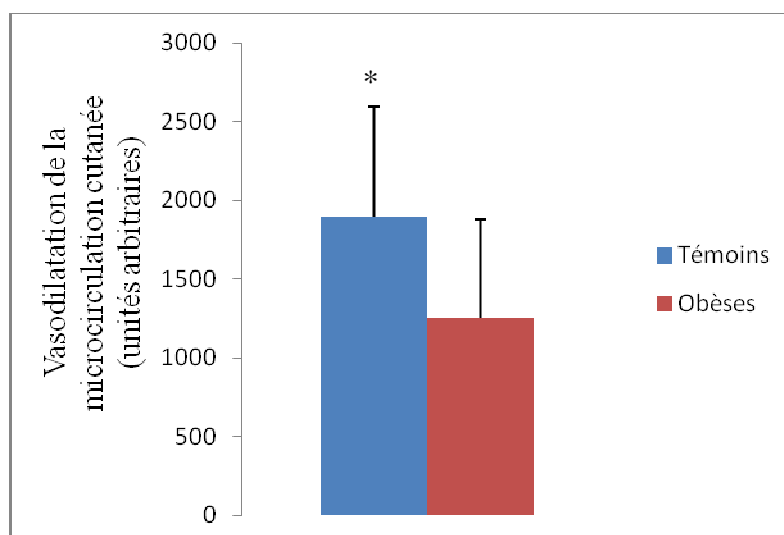


Figure 8. Variation de la réponse de l'endothélium à la chaleur de 44° C chez les 2 groupes avant l'entraînement.

Différence significative entre les obèses et les témoins avant l'entraînement (* $p < 0.05$)

Cette figure montre une différence significative entre les deux groupes avec une réduction de 38% chez les obèses par rapport aux témoins avant l'entraînement.

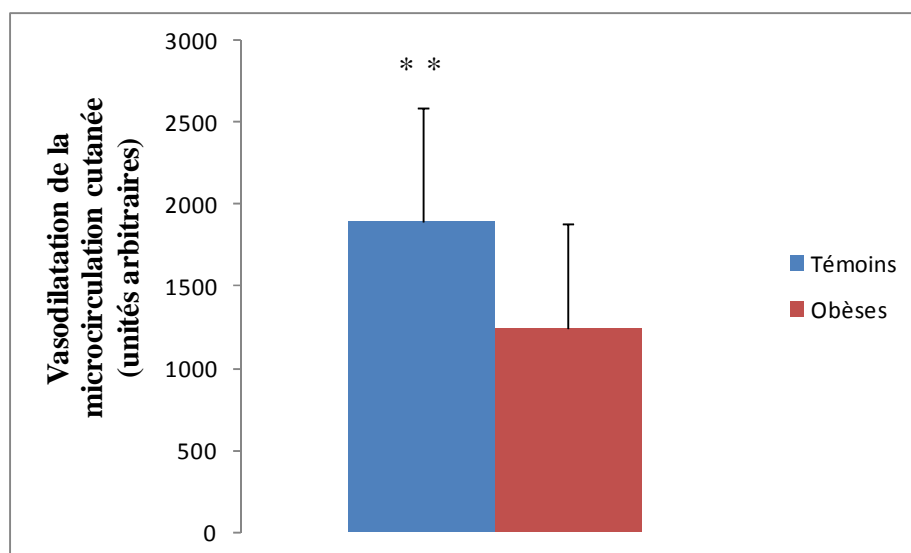


Figure 9. Variation de la réponse de l'endothélium à la chaleur de 44° C chez les 2 groupes après l'entraînement.

Différence significative entre les obèses et les témoins après l'entraînement (* $p < 0.05$)

Cette figure montre une différence significative entre les deux groupes avec une réduction de 34% chez les obèses par rapport aux témoins après l'entraînement.

3.4. Test de marche de 6 minutes (TM6)

Les résultats du test de marche avant et après entraînement sont récapitulés au tableau 3.

Tableau 3 : Effet de l'entraînement sur les paramètres mesurés lors du test de marche de 6 minutes chez les 2 groupes

	<i>Obèses</i>		<i>Témoins</i>		
	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>Avant</i>	<i>Après</i>	<i>P</i>
	<i>entraînement</i>	<i>entraînement</i>	<i>entraînement</i>	<i>entraînement</i>	
<i>Fc de repos(bpm)</i>	78 ± 4	71 ± 7*	72 ± 8	65 ± 4§	<0,05
<i>Saturation</i>	98 ± 0.01	98 ± 0.01	98 ± 0.01	98 ± 0.01	<0,05
<i>en oxygène (%)</i>					
<i>Distance</i>	385.50 ± 8.69	430.50 ± 8.75*	601.44 ± 5.1	720.38 ± 6.4§	<0,05
<i>parcourue (m)</i>					

Différence significative entre les obèses avant et après l'entraînement (* $p < 0.05$)

Différence significative entre les témoins avant et après l'entraînement (§ $p < 0.05$)

On a trouvé une amélioration significative de la distance de marche de 6 minutes dans les deux groupes de 11 % chez les obèses et de 19 % chez les témoins

3.5. Analyse statistique

Tous les résultats de cette étude sont présentés en moyenne \pm écart type. L'analyse statistique de cette étude est effectuée par le biais du Logiciel SPSS pour Windows version 17.0 (Chicago, IL).

Les tests statistiques utilisés sont :

Le test « t » de student, pour la comparaison intergroupe des moyennes de tous les résultats obtenus. A une valeur de $p < 0,05$, la différence entre les deux moyennes comparées est significative

Le test de « t » de student, échantillons dépendants, pour la comparaison de tous les paramètres avant et après l'entraînement (intragroupe). A une valeur de $p < 0,05$, la différence entre les deux moyennes comparées est considérée significative.

4. DISCUSSION

L'objectif de cette étude a été d'analyser l'effet d'un programme de réhabilitation par l'entraînement physique individualisé sur la fonction endothéliale et sur le statut inflammatoire chez les femmes obèses par rapport à un groupe témoin.

Le principal résultat de cette étude indique que les anomalies de la fonction endothéliale mesurées à l'état basal par le doppler laser couplé à l'iontophorèse d'acétylcholine régressent significativement après deux mois d'entraînement individualisé parallèlement à l'amélioration du statut pro-inflammatoire constaté chez les femmes obèses avant le programme de réhabilitation. L'amélioration de la fonction endothéliale endothélium dépendante est significativement plus élevée chez les femmes obèses par rapport à celle des témoins.

A notre connaissance, cette étude est la première qui a évalué l'effet d'un entraînement individualisé de deux mois chez les femmes obèses avec la mesure des paramètres de l'inflammation et de la fonction endothéliale chez des femmes témoins et obèses.

Sur le plan de la méthode, nous avons choisi l'entraînement à une puissance équivalente de 50 à 60% de la puissance maximale aérobie pour plusieurs raisons. Cette activité effectuée en groupe permet une meilleure prise en charge des obèses avec un effet groupe dont peut bénéficier chaque sujet. Il faut aussi noter que ce type de réentraînement a prouvé sa large efficacité dans plusieurs maladies respiratoires chroniques (23, 24) ainsi que chez des enfants obèses (25). L'intensité choisie permet une meilleure oxydation des lipides pendant l'exercice (26). L'ensemble de ces raisons justifie notre démarche expérimentale.

L'utilisation du test de marche de six minutes comme épreuve de terrain est largement validé et constitue un test simple, facile, reproductible et adapté aux sujets obèses. Les informations issues de ce test contribuent à une meilleure évaluation de la réponse cardiovasculaire et musculaire lors de l'exercice. Ce test constitue actuellement une exploration non onéreuse de l'aptitude aérobie. Plusieurs travaux ont analysé les facteurs déterminants de la distance de marche de six minutes. Ce qui nous a permis d'utiliser des valeurs de références spécifiques à la femme Tunisienne (27). Ces équations permettant une meilleure comparaison des distances mesurées par rapport aux normes locales. Les sociétés scientifiques recommandent l'usage d'équations de référence issues de la même population et qui répondent aux normes notamment biologiques. En effet, ces équations doivent provenir d'un échantillon de sujet sain en utilisant une modélisation statistique qui tient compte de la relation entre la distance de marche de six minutes et les caractéristiques anthropométriques (28). Nous avons ainsi utilisé des équations de références valables pour les femmes tunisiennes (27). Ces équations permettent le calcul de la distance de marche de six minutes prédite pendant un test standardisé. Puisque la DM6 est influencée par l'indice de masse corporelle pour un âge donné, la DM6 est plus faible dans le groupe des femmes obèses de 245 mètres. Ces résultats corroborent ceux de Séres et al. (29), ce qui explique que la baisse de la masse corporelle augmente la capacité aérobie. Il en est de même, lorsqu'on s'adresse au gain de masse grasse. En effet, ce dernier réduit la capacité aérobie (30) ainsi que la DM6 (31).

La technique du doppler laser et de l'iontophorèse constitue une méthode de référence dans l'évaluation de la fonction endothéliale. Elle combine la mesure du débit sanguin par doppler laser couplé à l'iontophorèse d'agent pharmacologique comme l'acétylcholine. Cette

technique a largement contribué à l'étude hémodynamique de la microcirculation (32). Elle constitue actuellement un moyen très avantageux par rapport aux mesures lors de l'hyperhémie réactive.

Sur le plan des résultats, notre étude met en évidence une baisse significative de la masse corporelle et de l'IMC, plus importante dans le groupe des femmes obèses et, qui résulte de la réponse à l'exercice musculaire.

D'ailleurs, l'augmentation de la dépense énergétique, en particulier lors de l'exercice de type aérobie est une conséquence de l'adaptation musculaire et métabolique. Elle permet une augmentation du taux maximal d'oxydation des lipides (LIPOXmax). C'est-à-dire une élévation de la contribution des lipides à la fourniture énergétique pendant l'exercice (18). A l'issue de la période de réhabilitation proposée aux femmes obèses et témoins, des modifications de leurs compositions corporelles ont été illustrées. La réduction de la masse corporelle, de l'IMC et de la masse grasse est significativement plus élevée dans le groupe des obèses. Nos constatations sont en accord avec les résultats des études précédentes (15, 33, 35).

L'utilisation accrue des lipides pendant l'exercice modéré permet l'augmentation de l'oxydation des lipides chez des sujets maigres (36) et obèses (15).

Chez la population obèse, l'entraînement de basse intensité peut être préférable qu'un entraînement de haute intensité en raison du risque de blessures musculo-squelettiques et de la meilleure adhésion à l'exercice (37). L'obésité est caractérisée par une capacité altérée de la mobilisation et de l'utilisation des lipides pendant l'exercice. Ainsi, l'entraînement à une

intensité qui correspond au LIPOXmax diminue ce dysfonctionnement métabolique et favorise l'oxydation des lipides. Zachwieja, et al. (38) a prouvé qu'une augmentation de l'oxydation lipidique pendant l'exercice en endurance est expliquée par l'économie des stocks de glycogène ainsi que par une capacité accrue d'oxyder plus de lipides après le programme d'entraînement. Cette amélioration de la capacité d'oxydation et des lipides peut être bénéfique pour la gestion de l'obésité, comme déjà mentionnée par Maffei et al. (39) chez l'enfant obèse mais aussi chez l'adulte avec une baisse du contenu lipidique du muscle (40). De plus, l'exercice augmente la réponse lipidique du tissu adipeux par une augmentation de l'expression et de l'activation de la lipase hormono-sensible (HSL) (41), réduisant de ce fait la difficulté de l'oxydation des lipides observée chez les obèses. (42). Il est donc clair que l'entraînement en endurance induit une réponse adaptative favorable pour réduire la masse grasse. Un autre bénéfice de l'oxydation élevée des lipides est l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les sujets obèses (43). Ce paramètre pourrait contribuer à améliorer par ailleurs la fonction endothéliale.

Ce travail confirme la dysfonction endothéliale qui est une anomalie précoce faisant le lit de l'athérosclérose et des maladies vasculaires chez l'homme. En effet, il a été démontré récemment que l'obésité induit une réduction franche de la vasodilatation endothélium dépendante chez la femme (8). Dans une étude précédente, la réserve vasodilatatoire chez les femmes obèses est réduite au niveau des capillaires de l'avant bras. Ce résultat suggère un déficit de la fonction endothéliale avec des anomalies de la relaxation et de la compliance vasculaire dans l'obésité (8). On retrouve dans ce travail les mêmes anomalies décrites précédemment avec une réduction de la vasodilatation endothélium dépendante. Cette

altération existe à deux niveaux, le premier est celui de la fonction endothéliale basale, le second est identifié lors de l'iontophorèse de l'Acétylcholine. La vasodilatation endothélium-dépendante est significativement réduite chez les femmes obèses, ce qui suggère une association entre l'obésité et la dysfonction endothéliale. Ce dysfonctionnement peut être expliqué par la sécrétion adipocytaire de peptides « adipokines », tel que la leptine, la résistine, le TNF α , l'IL6 dont les valeurs étaient significativement plus élevées par rapport aux femmes témoins. Le tissu adipeux participe physiologiquement à l'homéostasie énergétique de l'organisme mais aussi il intervient dans les fonctions cardiovasculaires (44). Un excès de masse grasse induit une réaction inflammatoire chronique par la libération anormale d'adipokines (45, 46). Il existe aussi une activation des voies de signalisation pro inflammatoires à l'origine des complications cardiovasculaires. En effet, la leptine induit un stress oxydatif avec la production des radicaux libres (47). Cette hormone stimule la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (TNF α et IL6) à l'origine de l'hypertension artérielle et dégrade la fonction endothéliale (48, 49). Ce qui explique que nos femmes obèses ont des taux élevés de TNF α et d'IL6. Le TNF α provoque une insulino-résistance et altère le fonctionnement de l'endothélium vasculaire. Le stress oxydatif aggrave le processus pathologique de la dysfonction endothéliale et aboutit à l'athérogenèse. Une production exagérée de TNF α est associée à une augmentation de l'activité de la NOS d'origine inductible. Cette protéine est responsable de la synthèse d'une quantité élevée de NO qui exerce des effets cardiotoxiques impliqués dans l'apoptose (50). Dans le même contexte, le TNF- α est impliqué dans l'augmentation de la perméabilité endothéliale (51) et inhibe la transcription et la post-transcription du gène qui code pour la NOS d'origine endothéliale.

Cette action explique la dysfonction endothéliale chez les obèses (52). De sa part, l'IL6 affecte aussi la fonction endothéliale (53). Ce médiateur augmente la perméabilité endothéliale en modifiant la distribution des jonctions serrées (54, 55), ce qui est cohérent avec nos résultats. D'autre part, le stress oxydant est à l'origine d'une dysfonction endothéliale chez les individus obèses (56). Il est associé à un déséquilibre du système anti-oxydant rendant précaire le statut de l'obèse qui serait plus exposé au stress oxydatif (57, 58). Les réactions d'oxydation jouent un rôle important dans l'athérogénèse ainsi que dans la dysfonction endothéliale. Les effets des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) sur la fonction vasculaire modulent la croissance des cellules musculaires vasculaires lisses et des fibroblastes (59). Leur production induit une toxicité cellulaire. Le nicotinamide adénine dinucléotide/NADPH oxydase est la source vasculaire majeure des ROS (60). Une forte corrélation a été démontrée entre l'activité de la NADPH oxydase, les facteurs de risques de l'athérosclérose et la dysfonction endothéliale (61). L'élévation des taux des acides gras augmente le stress oxydatif via la NADPH oxydase. L'augmentation de ce stress induit une dys-régulation de la production des adipokines qui est améliorée par la réduction pondérale (62). Dans le même ordre d'idées, nos résultats suggèrent que l'exercice musculaire agit ainsi. D'autre part, l'augmentation du stress oxydatif stimule la destruction de NO par la réduction de ces effets biologiques. La monoxyde d'azote synthase d'origine endothéliale (NOS_e) est cruciale pour l'homéostasie vasculaire mais peut participer à la pathogenèse de la dysfonction endothéliale (63). En effet, lorsque la NOS_e n'est pas couplée à la L-arginine ou à la BH4 (cofacteurs nécessaires à l'activité normale de la NOS_e), il y a génération de l'O₂⁻ et de H₂O₂ au lieu du NO. La NOS_e non couplée à son cofacteur, altère le fonctionnement

endothélial, diminue la biodisponibilité du NO, augmente la production d'O₂⁻ et la formation des peroxynitrites (ONOO⁻), la clé médiatrice de la peroxydation des lipides et de la formation des cellules spumeuses au niveau des lésions athérosclérotiques lors des hyperglycémies (64). L'augmentation de la production du TNF- α observée dans notre étude stimule l'activité de l'ADMA (65) : un important mécanisme par lequel l'obésité altère la biologie du NO et induit une altération de l'endothélium vasculaire (66). Cet aspect sera repris lors de la discussion de l'effet de l'exercice sur la fonction endothéliale chez les femmes obèses.

L'obésité constitue un facteur de risque très important aussi bien pour le système cardiovasculaire que pour les maladies métaboliques. Il a été prouvé que l'obésité altère la fonction endothéliale, ce qui constitue un facteur abaissant la perfusion des organes (8). La baisse de l'activité et de l'expression de la NO synthase ainsi que la production des anions superoxyde explique cette altération en particulier lorsqu'elle est associée à la production d'un inhibiteur de la NOS. En effet, les inhibiteurs endogènes de la NO synthase, en particulier la diméthylarginine asymétrique (ADMA) régule la production du NO. Deux enzymes métabolisent l'ADMA, les diméthylaminohydrolase (DDAH) qui ont un rôle clé dans les niveaux de NO (67). Ces anomalies sont aggravées par l'augmentation des facteurs vasoconstricteurs comme l'endothéline 1 et l'exagération de la stimulation sympathique. Toute cette mosaïque physiopathologique conduit aux anomalies vasculaires responsables de plusieurs atteintes organiques.

Notre étude suggère fortement une nette amélioration de la fonction endothéliale ainsi qu'une amélioration du profil pro-inflammatoire, après le programme de réhabilitation basé sur

l'exercice musculaire individualisé. L'amélioration de la fonction endothéliale chez les femmes obèses peut être expliquée par plusieurs modifications de la boucle physiopathologique. En effet, l'exercice à lui seul réduit la résistance à l'insuline dans le diabète et dans le syndrome métabolique, mais aussi module les concentrations d'adiponectine et de ghréline, ce qui améliore directement la fonction endothéliale (68). D'un autre côté, notre étude démontre que l'exercice musculaire permet un effet bénéfique sur le système vasculaire. Ces effets sont directs et indirects. L'exercice améliore directement la structure et la fonction vasculaire puisqu'il garantit l'intégrité de la fonction endothéliale, diminue le stress oxydant et constitue un promoteur du développement vasculaire au sein des muscles en activité. Les effets indirects de l'exercice ciblent la réduction des facteurs de risques vasculaires, notamment l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle ainsi que le diabète et la résistance à l'insuline (69). Les études expérimentales avaient démontré une augmentation de la vasodilatation endothélium dépendante provoquée par l'acétylcholine sur des modèles animaux (22). Dans le même cadre, l'entraînement physique augmente la vasodilatation endothélium dépendant au niveau de l'avant-bras chez des hypertendus ainsi que chez des sujets sains. L'exercice modéré mais non intense ou léger représente une stratégie préventive des complications cardiovasculaires et permet d'améliorer la fonction endothéliale chez les sujets sains et hypertendus. Pour les sujets obèses, ayant une forte prévalence de co-morbidité, les programmes d'exercice musculaire pourraient être construits d'une manière individualisée qui reflètent une activité quotidienne modérée. L'exercice peut agir aussi sur les cellules en provenance de la moelle osseuse. En effet, les progéniteurs (endothelial progenitor cells EPCs) augmentent par l'exercice musculaire et ce paramètre peut

influencer largement l'amélioration de la fonction endothéliale chez les femmes obèses après deux mois d'entraînement (70), ce qui est cohérent avec nos résultats. Un autre résultat publié dans la littérature corrobore l'effet bénéfique de l'exercice par la baisse de l'insulinorésistance chez l'enfant et chez l'adulte obèses (17, 25, 71). Par ailleurs, La présence d'une baisse de l'hyperhémie réactive dans le syndrome métabolique implique aussi une dysrégulation parasympathique. L'exercice est connu pour améliorer l'état du système parasympathique et par conséquent, nos résultats suggèrent qu'une partie de l'amélioration de la fonction endothéliale peut bien être expliquée par ce mécanisme (72). Il a aussi été montré que l'obésité est associée à une augmentation des résistances artériolaires dont le mécanisme est l'altération de la fonction endothéliale dans un contexte d'inflammation systémique (73). Il a été aussi prouvé récemment que les programmes d'exercices dans le cadre extrascolaire constituent une stratégie préventive pour améliorer la fonction endothéliale et la santé cardiovasculaire chez des enfants obèses. Ces résultats peuvent aussi constituer en soi un modèle thérapeutique expliquant les réponses prometteuses observés chez les femmes obèses entraînées dans cette étude.

Notre étude valorise encore plus l'exercice musculaire individualisé comme outil incontournable dans la lutte contre les facteurs de risques vasculaires chez l'obèse (74).

5. CONCLUSION

Après la discussion des résultats, nous pouvons conclure que notre hypothèse est vérifiée et que l'entraînement physique individualisé améliore significativement la fonction endothéliale et réduit l'agression engendrée par les biomarqueurs de l'inflammation chez les femmes

obèses. L'exercice musculaire exerce un effet bénéfique sur le système vasculaire. Ces effets sont directs et indirects. Il améliore directement la structure et la fonction vasculaire puisqu'il garantit l'intégrité de la fonction endothéliale, diminue l'inflammation systémique et constitue un promoteur du développement vasculaire au sein des muscles en activité. Les effets indirects de l'exercice touchent la réduction des facteurs de risques vasculaires, notamment l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle ainsi que le diabète.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Prentice AM, Jebb SA. Obesity in Britain: gluttony or sloth? BMJ 1995 ; 311(7002):437-439.
2. Bocquier A, Paraponaris A, Gourheux JC, Lussault PY, Basdevant A, Verger P. La prise en charge de l'obésité: Attitudes, connaissances et pratiques des médecins généralistes en région PACA ; résultats d'une enquête téléphonique. La Presse Médicale 2005 ; 34 : 769–775
3. Maire B, Lioret S. Transition nutritionnelle et maladies chroniques non transmissibles liées à l'alimentation dans les pays en développement. INN. Evaluation de l'état nutritionnel de la population. Enquête nationale de nutrition 1996/97. Ministère de la Santé Publique, insut national de nutrtrion, rapport 2000 Cahiers d'études et de recherches francophones / Santé. Volume 12, Numéro 1, 45-55, Janvier - Février 2002, Questions nouvelles
4. Gartner A, Delpeuch F, Kumari BS, Chandra MD RK. Overnutrition and immune responses Nutrition Research Volume 13, Supplement 1, 1993, Pages S3–S18
5. Kumari et Chandra, 1993 Organisation mondiale de la santé. Obésité et surpoids Aide-mémoire N°311. Mars 2013, INS, 1995
6. Mokhtar N, Elati J, Chabir R, Bour A, Elkari K, Schlossman NP, Caballero B, Aguenou H. Khatib. 2004 Diet Culture and Obesity in Northern Africa. J Nutr 2001; 131:887-892.

7. Beltaifa L, Gaigi S, Ben Alaya N, Delpeuch F. Le modèle causal obésité en Tunisie. In : Sahar A.Y. (ed.), Le Bihan G. (coord.). L'approche causale appliquée à la surveillance alimentaire et nutritionnelle en Tunisie. Montpellier : CIHEAM, 2002. p. 71-93. (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 41)
8. Miâdi-Messaoud H, Chouchane A, Abderrazek E, Debbabi H, Zaouali-Ajina M, Tabka Z, Ben-Jebria A. Obesity-induced impairment of endothelium-dependent vasodilation in Tunisian women. *Int J Obes* 2010; 34(2):273-279.
9. Félétou M and Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291 (3): H985-H1002.
10. Le Brocq M, Leslie SJ, Milliken P, Megson IL. Endothelial dysfunction: from molecular mechanisms to measurement, clinical implications, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2008 ; 10 (9) : pp 1631-1674.
11. Poitou C, Clément K. Le tissu adipeux : un acteur majeur du syndrome inflammatoire de l'obésité ? *Cahiers de Nutrition et de Diététique* 2007 ; 42 (2) : pp 90-96.
12. Kong LC, Willemin PH, Bastard JP, Sokolovska N, Gougis S, Fellahi S, Darakhshan F, Bonnefont-Rousselot D, Bittar R, Doré J, Zucker JD, Clément K, Rizkalla S. Insulin resistance and inflammation predict kinetic body weight changes in response to dietary weight loss and maintenance in overweight and obese subjects by using a Bayesian network approach. *Am J Clin Nutr* 2013.

13. Epstein LH, Coleman K, Myers M. Exercise in treating obesity in children and adolescent. *Med Sci Sports Exerc* 1996; 28:428-435.
14. Bar-or O. New and old in pediatric exercise physiology. *Int J Sports Med* 2000; 21:113-116.
15. Brandou F, Dumortier M, Garandeau P, Mercier J, Brun JF. Effects of two-month rehabilitation program on substrate utilization during exercise in obese adolescent *Diabete Metab* 2003; 29:20-27.
16. Lazzer S, Boirie Y, Montaurier C, Vernet J, Meyer M, Vermorel M. A weight reduction program preserves fat-free mass but not metabolic rate in obese adolescents. *Obes Res* 2004; 12:233-240.
17. Ben Ounis O, Elloumi M, Zouhal H, Makni E, Denguezli M, Amri M, Lac G, Tabka Z. Effect of individualized exercise training combined with diet restriction on inflammatory markers and IGF-1/IGFBP-3 in obese children. *Ann Nutr Metab* 2010; 56(4):260-266.
18. Ben Ounis O, Elloumi M, Ben Chiekh I, Zbidi A, Amri M, Lac G, Tabka Z. Effects of two-month physical-endurance and diet-restriction programmes on lipid profiles and insulin resistance in obese adolescent boys. *Diabetes Metab* 2008; 34(6 Pt 1):595-600.
19. Tremblay A, Simoneau JA, Bouchard C. Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. *Metabolism* 1994; 43:814-818.

-
20. Léger, P. Exploration de la microcirculation: débitmétrie Doppler laser. EMC-Cardiol. Angéiol 2005 ; 2: 81-85.
21. Carpentier PH. Laser-Doppler: principles and indications. J Phy 1987; 48: 271-274.
22. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980; 288 (5789) : 373-376
23. Ben Cheikh Rejbi I, Trabelsi Y, Chouchene A, Ben Turkia W, Ben Saad H, Zbidi A Kerkeni A, Tabka Z. Changes in six minute walking distance during pulmonary rehabilitation in patient with COPD and in healthy subject. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2010; 5: 209–215.
24. Mkacher W, Tabka Z, Aouichaoui C, Chaieb F, Gueddes M, Zaouali M, Zbidi A, Trabelsi Y. Effect of rehabilitation program on GH/IGF-1/IGF-BP3 axis and Testosterone/Cortisol ratio in patients with COPD and in healthy subjects. Int J Ther Rehabil 2012; 1: 2
25. Ben Ounis O, Elloumi M, Zouhal H, Makni E, Lac G, Tabka Z, Amri M. Effect of an individualized physical training program on resting cortisol and growth hormone levels and fat oxidation during exercise in obese children. Ann Endocrinol (Paris) 2011; 72(1):34-41.
26. Ounis O, Elloumi M, Makni E, Zouhal H, Amri M, Tabka Z, Lac G. Exercise improves the ApoB/ApoA-I ratio, a marker of the metabolic syndrome in obese children. Ben Acta Paediatr 2010; 99(11):1679-85.

27. Ben Saad H, Prefaut C, Tabka Z, Hadj Mtir A, Chemit M, Hassoune R et al. 6-Minute walk distance in healthy North Africans older than 40 years: influence of parity. *Res Med* 2009; 103: 746-784.
28. American Thoracic Society. ATS statement: guidelines for the six minute walk test. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 111-117
29. Séres L, Lopez-Ayerbe J, Coll R. Increased exercise capacity after surgically induced weight loss in morbid obesity. *Obesity* 2006; 14: 273-279.
30. Souza SAF, Faintuch J, Valezi AC, Cecconello I. Postoperative improvement of aerobic capacity after anti-obesity gastric bypass. *Hepatol Gastroenterol* 2006; 53: 248.
31. Hulens M, Vansant G, Lysens R, Claessens AL, Muls E. Exercise capacity in lean versus obese women. *Scand J Med Sci Sports* 2001; 11: 305-309.
32. Leahy MJ, de Mul FFM, Nilsson GE, Maniewski R. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. *Technol Health Care* 1999; 7: 143-162.
33. Dumortier M, Brandou F, Perez-Martin A, Fedou C, Mercier J, Brun JF. Low intensity endurance exercise targeted for lipid oxidation improves body composition and insulin sensitivity in patient ts with the metabolic syndrome. *Diabetes Metab* 2003;29:509
34. Lazzer S, Boirie Y, Montaurier C, Vernet J, Meyer M, Vermorel M. A weight reduction program preserves fat-free mass but not metabolic rate in obese adolescents. *Obes Res* 2004;12:233-240.

35. Lazzer S, Boirie Y, Poissonnier C, Petit I, Duché P, Taillardat M, Meyer M, Vermorel M. Longitudinal changes in activity patterns, physical capacities, energy expenditure, and body composition in severely obese adolescents during a multidisciplinary weight-reduction program. *Int J of Obesity Lond* 2005;29:37-46
36. Friedlander A, Casazza GR, Horning M, Usaj A, Brooks GA. Endurance training increases fatty acid turnover, but not fat oxidation in young men. *J Appl Physiol* 1999;86:2097-2105
37. Bouchard C, Després JP, Tremblay A. Exercise and obesity. *Obes Res* 1993;1:133-134
38. Zachwieja JJ. Exercise as treatment for obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1996; 25:965-988.
39. Maffeis C, Castellani M. Physical activity: An effective way to control weight in children? *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007;17:394-408
40. Bajpeyi S, Reed MA, Molskness S, Newton C, Tanner CJ, McCartney JC, Houmard JA. Effect of short-term exercise training on intramyocellular lipid content. *Appl Physiol Nutr Metab* 2012; 37(5): 822–828.
41. Crampes F, Riviere D, Beauville M, Marceron M, Garrigues M. Lipolytic response of adipocytes to epinephrine in sedentary and exercise trained subjects: sex-related differences. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1989;59:249-255.

-
42. Van Aggel-Leijssen DP, Saris WH, Hul GB, Van Baak MA. Short-term effects of weight loss with or without low-intensity exercise training on fat metabolism in obese men. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:523-531?
43. Goodpaster BH, Katsiaras A, Kelley DE. Enhanced fat oxidation through physical activity is associated with improvement in insulin sensitivity in obesity. *Diabetes* 2003;52:2191-2197
44. Casteilla L, Charrière G, Laharrague P, Cousin BV, Planat-Benard V, Péricaud L et al. Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery: come back to sources. *Ann Chirur Plast Esthé* 2004; 49: 409-418.
45. Correia ML, Haynes WG. Leptin, obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypert* 2004 ; 13 (2) :215-223.
46. Fève B, Bastard JP. Adipokines : au coeur de la relation entre obésité et insulinorésistance. *Mt Cardio* 2007 ; 3 (1) :24-38.
47. Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *Faseb J* 1999; 13 (10):1231-1238.
48. Chu NF, Chang JB, Shieh SM. Plasma leptin, fatty acids and tumor necrosis factor-receptor and insulin resistance in children. *Obes Res* 2003; 11 (4) :532-540
49. Bullo M, Garcia-Lorda P, Megias I, Salas-Salvado J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res* 2003; 11 (4): 525-531.

50. Paz Y, Frolkis I, Pevni D, Shapira I, Yuhas Y, Iaina A et al. Effect of tumor necrosis factor-alpha on endothelial and inducible nitric oxide synthase messenger ribonucleic acid expression and nitric oxide synthesis in ischemic and nonischemic isolated rat heart. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42 (7):1299-1305.
51. Dodd-o JM, Welsh LE, Salazar JD, Walinsky PL, Peck EA, Shake JG et al. Effect of NADPH oxidase inhibition on cardiopulmonary bypass induced lung injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287 (2) : H927-H936
52. Anderson HD, Rahmutula D and Gardner DG. Tumor necrosis factor-alpha inhibits endothelial nitric-oxide synthase gene promoter activity in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279 (2):963-969.
53. Yan SF, Ogawa S, Stern DM and Pinsky DJ. Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6. *Kidney Int* 1997; 51 (2): 419-425.
54. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ and Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101 (15) :1767-1772
55. Aljada A, Ghanim H, Assian E, Dandona P. Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin-induced increase in endothelial nitric oxide synthase and reduces insulin receptor content and phosphorylation in human aortic endothelial cells. *Metabolism* 2002; 51 (4):487-491.

-
56. Yukihiro H, Shota S, Keigo N, Hideo M, Goro K, Tetsuya, O. Effect of the angiotensin-converting enzyme inhibitor imidapril on reactive hyperemia in patients with essential hypertension: relationship between treatment periods and resistance artery endothelial function. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 863-870.
57. Nakao C, Ookawara T, Sato Y, Kizaki T, Imazeki N, Matsubara O et al. Extracellular superoxide dismutase in tissues from obese (ob/ob) mice. *Free Radic Res* 2000; 33 (3): 229-241.
58. Jang Y, Lee JH, Cho EY, Chung NS, Topham D, Balderston B. Differences in body fat distribution and antioxidant status in Korean men with cardiovascular disease with or without diabetes. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (1): 68-74.
59. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82 (1):47-95.
60. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I. Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108 (16):1912-1916.
61. Cai H, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II induced vascular NAD (P) H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24 (9):471-478.
62. Dadona P, Mohanty P, Ghanim H et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes,

- lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:355-362.
63. Brett E, Fenster PS, Tsao SG, Rockson. Endothelial dysfunction: clinical strategies for treating oxidant stress. *Curriculum in Cardiology* 2003; 146 (2) : 218-226.
64. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96 (1):25-28.
65. Saitoh M, Osanai T, Kamada T, Matsunaga T, Ishizaka H, Hanada H. et al. High plasma level of asymmetric dimethylarginine in patients with acutely exacerbated congestive heart failure: role in reduction of plasma nitric oxide level. *Heart Vessels* 2003; 18 (4):177-182.
66. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor, asymmetric dimethylarginine. *Metabolism* 2004; 53 (12):1574-1579.
67. Toda N, Okamura T. Obesity impairs vasodilatation and blood flow increase mediated by endothelial nitric oxide: An overview. *J Clin Pharmacol* 2013. doi: 10.1002/jcph.179.
68. Maggio AB, Wacker J, Montecucco F, Galan K, Pelli G, Mach F, Beghetti M, Farpour-Lambert NJ. Serum resistin and inflammatory and endothelial activation markers in obese adolescents. *J Pediatr* 2012;161(6):1022-1027.

69. Conti AA, Macchi C. Protective effects of regular physical activity on human vascular system. Clin Ter 2013; 164(4):293-4.
70. Koutroumpi M, Dimopoulos S, Psarra K, Kyprianou T, Nanas S. Circulating endothelial and progenitor cells: Evidence from acute and long-term exercise effects. World J Cardiol 2012 26; 4(12):312-326.
71. Constantin-Teodosiu D. Regulation of Muscle Pyruvate Dehydrogenase Complex in Insulin Resistance: Effects of Exercise and Dichloroacetate. Diabetes Metab J 2013; 37(5):301-314.
72. Rossi AM, Davies E, Lavoie KL, Arsenault A, Gordon JL, Meloche B, Bacon SL. The impact of metabolic syndrome and endothelial dysfunction on exercise-induced cardiovascular changes. Obesity (Silver Spring). 2013; 21(1):E143-8.
73. Suboc TM, Dharmashankar K, Wang J, Ying R, Couillard A, Tanner MJ, Widlansky ME. Moderate Obesity and Endothelial Dysfunction in Humans: Influence of Gender and Systemic Inflammation. Physiol Rep 2013 1; 1(3).
74. Park JH, Miyashita M, Kwon YC, Park HT, Kim EH, Park JK, Park KB, Yoon SR, Chung JW, Nakamura Y, Park SK. A 12-week after-school physical activity programme improves endothelial cell function in overweight and obese children: a randomised controlled study. BMC Pediatr 2012 ; 12:111.

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

Discussion Générale et Conclusion

Depuis la nuit des temps, l'homme a certes utilisé, entre autres son cerveau mais aussi l'activité physique (AP) pour exister, continuer à exister et permettre à notre espèce de se développer. Sans le savoir, en ces temps reculés, par l'activité physique, il prévenait ou traitait d'éventuels dysfonctionnements de l'endothélium (DE) artériel liés aux pathologies cardiovasculaires. En effet, on sait, actuellement, que l'exercice physique est bénéfique pour la santé et particulièrement pour le système cardiovasculaire. Parmi les tissus impactés, l'endothélium vasculaire a la capacité d'être modifié par une activité physique adaptée. Cette modification est particulièrement bénéfique, entre autres, sur la vasodilatation endothélium dépendante (VED) via le NO/EDRF. Ce bénéfice est double : à titre préventif d'une part mais d'autre part lorsqu'une dysfonction endothéliale est installée dans certaines pathologies ou pour certains facteurs de risques cardiovasculaires (diabète, sédentarité, surpoids, obésité, tabagisme,...).

De nos jours, après une évolution scientifique et technique exponentielle, l'augmentation inquiétante de la sédentarité conduit à l'effet inverse: la VED est, au contraire, altérée.

A cela s'ajoutent des pratiques alimentaires à risques également pour la physiologie cardiovasculaire et conduisant aussi à altérer la fonction endothéliale.

Des campagnes d'informations émanant du Programme National Nutrition Santé -PNNS- (2001) ont tenté d'encourager des habitudes alimentaires plus saines et la pratique d'une AP adaptée, mais il faut encore accentuer ces campagnes pour mieux sensibiliser encore nos concitoyens (ex. www.mangerbouger.com). Développer les recherches sur ces thématiques

est essentiel et permettra d'amplifier l'argumentation et donc le pouvoir de persuasion du PNNS. Nous espérons, par nos travaux sur le versant AP, participer à la valorisation des connaissances scientifiques. Certes l'AP a une fonction préventive vis-à-vis de la DE mais, de plus, de nombreuses démarches thérapeutiques associent maintenant l'AP au traitement médicamenteux dans le traitement curatif de nombreuses maladies cardiovasculaires (HTA, IC, hypercholestérolémie, diabète, ...) permettent aussi d'atténuer la VED liée à ces pathologies. Cependant, les paramètres de l'AP (endurance, résistance, fréquence, intensité) sont encore à préciser tant pour la prévention de la DE que pour la restaurer en curatif vis-à-vis de différentes pathologies et facteurs de risques cardiovasculaires. Ainsi, nos travaux ont eu pour objectifs:

- 1- de déterminer, par une approche expérimentale, les effets d'un entraînement intense sur les mécanismes responsables de la vasodilatation endothélium dépendante induite par l'Ach et par un ADP stable (l'adenosine-5-O-2-thiodiphosphate-ADP β S-) via le NO chez des rats rendus diabétiques (type 1). Cette étude est réalisée sur l'aorte thoracique isolée de rats.
- 2- D'explorer, par une approche clinique, l'effet de l'entraînement chez des sujets jeunes (comparés à des sujets sédentaires) sur la régulation de la vasomotricité par l'endothélium avant et après un exercice aigu.
- 3- D'analyser les effets d'un entraînement individualisé de deux mois chez des femmes obèses comparativement à des témoins, sur la fonction endothéliale et sur les biomarqueurs de l'inflammation.

- **Notre première étude**, chez le rat diabétique type 1, montre que le diabète diminue les vasodilatations endothélium dépendantes (VED) induites par l'ACh et l'ADP β S respectivement de 35% et 26%. Dans cette population, la VDE induite par l'ADP β S constitue une information originale. Nous observons qu'un entraînement intense en endurance n'induit pas d'effets bénéfiques sur la VED de l'aorte dans le groupe contrôle et ne peut pas diminuer la dysfonction endothéliale induite par le diabète de type 1. Par ailleurs, dans tous les groupes, il n'a pas été observé que le L-NAME réduit fortement les VED induites par l'ACh et l'ADP β S démontrant qu'elles sont médiées par la voie du NO.

Dans notre modèle de rat diabétique, la concentration élevée du glucose sanguin comparativement à des animaux sains, confirme l'absence de sécrétion d'insuline consécutivement au traitement à la STZ. Notre programme d'entraînement conduit à diminuer la glycémie qui fut plus basse dans le groupe des rats diabétiques entraînés comparativement aux diabétiques sédentaires. De plus, la diminution drastique du poids du corps confirme l'état diabétique. L'entraînement des rats diabétiques de type 1 conduit à un gain de poids dû à une augmentation de la masse musculaire, mais cette augmentation ne permet pas de ramener le poids à celui d'un animal sain. Ces observations sont en accord avec les données de la littérature relative aux variations de poids du corps chez des animaux diabétiques de type 1 (DeSouza et coll, 2000). L'augmentation de l'activité citrate synthase démontre l'efficacité de notre programme d'entraînement. Ce programme d'entraînement induit une plus grande augmentation de l'activité citrate synthase chez les rats diabétiques type 1 que chez les rats contrôles.

Nous observons, dans cette première étude que la vasoconstriction induite par la phényléphrine est augmentée chez des rats diabétiques traités à la STZ dans le cadre d'une courbe dose-réponse. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature (Martinez-Nieves et coll, 1999). Le mécanisme de cette potentialisation des contractions induites par la phényléphrine passerait par une augmentation de la sensibilité des récepteurs alpha-adrénergiques à cet agoniste (idem).

Le fait qu'il y a décroissance de la VED induite par l'ACh et l'ADP β S est la preuve de l'existence d'une dysfonction endothéliale chez les rats rendus diabétiques de type I par la STZ : En effet, le diabète est connu comme inducteur d'une réduction de la VED induite par l'ACh (Tremblay et coll, 1994). Les récepteurs médiant cette VED sont de type muscariniques (M1-M3) pour ceux à l'ACh et purinergiques pour l'ADP (et l'ADP β S) ils sont appelés P2Y. Nous formulons l'hypothèse que leur modification et/ou celle des signaux intracellulaires que leur stimulation engendre pourrait être entre autres, une des causes de la réduction de l'EDV chez ces rats diabétiques. Par ailleurs, il a été montré que l'ADP β S, via des récepteurs purinergiques P2Y, induit la sécrétion d'insuline par les cellules beta des îlots de Langerhans pancréatiques et la vasodilatation du lit vasculaire pancréatique (Hillaire-Buys et coll, 2003). De ce fait, il est important, pour une bonne régulation de la glycémie, que la sécrétion d'insuline soit accompagnée par une vasodilatation. Cette vasodilatation favorise les effets de l'insuline et permet de répondre aux besoins métaboliques et énergétiques des tissus et organes de l'organisme. En conséquence, nous pouvons proposer que, d'un point de vue physiopathologique, la dysfonction endothéliale du lit vasculaire pancréatique, donc une moindre vasodilatation peut, à elle seule, indépendamment de la diminution de sécrétion

d'insuline, perturber la régulation de la glycémie. Il apparaît, dans nos expériences, que la réduction de l'EDV fut plus élevée chez les rats diabétiques quand elle est induite par l'ACh que par l'ADP β S. Les VED induites par l'ACh comme par l'ADP β S sont médiées par la libération de NO/EDRF par les cellules endothéliales de l'intima puis, consécutivement, la stimulation de la Guanylate cyclase d'où production de GMPc puis relaxation des cellules musculaires lisses de la media. La diminution de la biodisponibilité du NO/EDRF serait probablement une des causes de cette altération de la vasodilatation. Signalons que, chez les rats diabétiques la diminution de l'VED induite par l'ADP β S a été décrite dans articles antérieurs (Csanyi et coll, 2007). Il est souvent décrit que les nucléotides tels que l'ADP, présents dans le milieu extracellulaire, contribuent à la régulation locale du diamètre des vaisseaux et jouent un rôle clé dans certains processus pathophysiologiques.

Concernant l'ADP et son interaction avec les récepteurs P2Y1 endothéliaux chez des rats diabétiques de type 1 (obtenus après injection de STZ), il a récemment été proposé que la voie de la NOSynthase pourrait être réduite après interaction de l'ADP avec ses récepteurs P2Y1 (Ishida et coll, 2013). En fait, toute perturbation de la signalisation via les récepteurs P2 stimulés par l'ADP β S au niveau de l'endothélium du lit vasculaire pancréatique aussi bien qu'au niveau des cellules beta, peut conduire à la fois à une dysfonction endothéliale et une dysfonction de la régulation de la glycémie. Ainsi apparaît une nouvelle voie de recherche visant à rectifier ces dysfonctionnements ciblant le système de signalisation médiée par des récepteurs purinergiques P2Y présents au niveau des cellules endothéliales et des cellules beta. Par ailleurs, l'ADP aussi bien que l'ATP, l'AMP et l'adénosine) peuvent hyperpolariser la membrane cytoplasmique des cellules endothéliales alors que l'ATP et l'ADP dépolarisent la

membrane des cellules musculaires lisses vasculaires (Chen et coll, 1991). Comme signalé plus haut, par interaction avec les récepteurs purinergiques P2Y1 endothéliaux, l'ADP ou l'ADP β S pourraient stimuler la production d'EDHF par l'endothélium. Puis, dans un second temps, l'EDHF induit l'hyperpolarisation de la membrane du muscle lisse vasculaire via une ouverture des canaux potassiques et la vasodilatation apparaît (Bajpeyi et coll, 2012). D'autre part, l'ADP (l'ADP β S en expérimental) est très impliqué dans le processus de régulation de la glycémie. C'est ainsi qu'Hillaire-Buys et coll (2003) indiquent que l'ADP β S, en interagissant avec des récepteurs P2Y serait capable de moduler l'VED dans le lit vasculaire pancréatique. Ainsi, des agonistes spécifiques des récepteurs P2Y tels que l'ADP β S induisent les sécrétions de NO/EDRF et d'EDHF par les cellules endothéliales.

Nos résultats démontrent que la voie du NO/EDRF est impliquée dans le mécanisme moléculaire des VED induites par l'ACh et l'ADP β S, comme décrit dans d'autres études (Séres et coll, 2006 ; Hulens et coll, 1999). Nous observons que la voie NO/EDRF fut impliquée dans les VED induites par ACh et ADP β S dans la même proportion chez les rats contrôles et les rats rendus diabétiques par STZ. Les parties des EDV induites par ACh et ADP β S qui ne sont pas inhibées par le L-NAME (inhibiteur de la NOSynthase) pourraient être médiées par PGI2 et EDHF, il serait intéressant d'explorer les conséquences d'un entraînement chez des rats normaux et diabétiques vis à vis de l'implication de PGI2 et EDHF.

Tout en vérifiant, par le Nitroprussiate (donneur de NO agissant directement sur le muscle lisse vasculaire) que les capacités de relaxation du muscle lisse sont intactes, nous montrons également, dans cette étude, que l'exercice intense en endurance n'est pas capable de

potentialiser et/ou rétablir les EDV induites par L'ACh d'une part et l'ADP β S d'autre part chez les rats contrôles et chez les rats diabétiques type 1 (induction par STZ). Ce phénomène pourrait être expliqué par une production excessive de ROS induit par un shear stress (forces de cisaillement) important, lui-même conséquence de l'exercice intense que suivent nos groupes d'animaux. Certes, de fait, le principal stimulus de la voie de la NOSynthase est le shear stress induit par l'exercice physique (Correia et coll, 2004). En effet, le shear stress stimule des capteurs membranaires présents sur la surface luminale de l'intima et ceci a pour conséquence d'induire une vasodilatation via le NO/EDRF. En conséquence, VED pourrait être plus importante lorsqu'un exercice est pratiqué. Par contre, des exercices intenses sont bien connus pour être inducteurs de stress oxydant et donc producteurs de ROS (Fève et coll, 2007). Ainsi, des études antérieures, réalisées sur l'aorte thoracique isolée du rat dans des conditions hypoxiques (en présence de molécules interagissant avec les systèmes de production des radicaux libres oxygénés) ont montré que des ROS (anion superoxyde, hydroxyle,...) modifient l'état vasomoteur des anneaux d'aorte isolée (Saïag et coll, 1999). Le « piégeage » du NO/EDRF par l'anion superoxyde associé à une production d'espèces réagissant avec l'oxygène (ROS) peut supporter cette hypothèse. De plus, l'obtention d'une correcte VED requiert que le couplage entre les récepteurs et la NOS ainsi que le couplage de la NOS avec le cofacteur BH4 soient optimum. L'inefficacité du programme d'entraînement physique de nos rats diabétiques (type 1) à réduire la dysfonction endothéliale (ou rehausser VED) pourrait être expliquée par le fait que l'exercice intense favorise le stress oxydant et conduit à découpler NOSe du cofacteur BH4 (Ben Ounis et coll 2010 ; Lazzer et coll, 2005). De même l'hypothèse Akt peut être proposée. En effet, lorsqu'il y a une DE, il a

été observé une baisse de la régulation du couplage NOSe/Akt inducteur de la production de NO/EDRF par l'endothélium. En plus de la production d'anion super oxyde, de ROS et d'une baisse de la régulation du système eNO/Akt, peuvent être invoquées les productions d'acide lactique et autres molécules lorsque le shear stress est très élevé.

Nous déduisons que notre protocole d'entraînement en endurance fut appliqué à une très grande intensité à notre population de rats diabétiques de type 1, et contrôles, alors qu'une intensité plus modérée a des effets bénéfiques (potentialisateurs) de la VED (Brandou et coll 2003). Notre programme d'entraînement s'est donc révélé trop intense et, en conséquence, inadapté à réduire la dysfonction endothéliale, vis-à-vis de la VED, chez des rats diabétiques de type 1.

Pour expliquer la réduction des VED chez les diabétiques (mais aussi dans d'autres pathologies), il pourrait être intéressant de poursuivre des investigations particulièrement vis-à-vis du métabolisme du NO et de ses interactions avec des molécules impliquées dans le stress oxydant (anion super oxyde, anion hydroxyle, superoxide dismutase, catalase,...) comme démontré sur aorte thoracique de rat en survie dans des conditions hypoxiques (Zachweija et coll, 1996). Rappelons que cette implication d'un stress oxydant augmentant graduellement lors d'un exercice d'intensité croissante est décrite dans la littérature, alors qu'au repos le niveau de stress oxydatif est très bas. Il serait également intéressant, tant chez les diabétiques que dans d'autres pathologies ou d'autres conditions de déterminer si le couplage eNOS/BH4 ou Akt/eNOS ou d'autres systèmes sont déficients.

Notre deuxième étude est une étude clinique par LDF (Laser Doppler Flowmetry) et démontre que la réponse FSBF (Forearm Skin Blood Flow) la VED induite par l'injection iontophorétique d'ACh fut significativement augmentée chez des jeunes hommes comparativement aux contrôles après un exercice isolé aigu. Nous pouvons alors proposer, par ce premier résultat, que l'entraînement de ces jeunes volontaires sains potentialise significativement la VED visualisée par la réponse FSBF.

Les caractéristiques physiques et cliniques indiquent que, dans le groupe des « entraînés » (T), la masse corporelle est inférieure à celle des sédentaires. Cette différence est due à l'entraînement régulier; en effet, l'entraînement physique diminue la masse grasse (Conti et Macchi, 2013). Comme on pouvait s'y attendre, une augmentation significative du pic $\dot{V}O_2$ et une baisse significative du rythme cardiaque (HR) au repos, ces résultats sont en accord avec la littérature (Goto et coll, 2003; Heylen et coll, 2005). Donc, les maladies cardiovasculaires des adultes sont établies dans l'enfance et accélérées par des conditions morbides telles que la sédentarité, une alimentation non équilibrée, l'obésité et la fumée de tabac.

Pour cette étude, nous avons utilisé la technique de mesure du flux sanguin par Laser Doppler (LDF) qui permet d'évaluer la qualité du fonctionnement de l'endothélium. Cette approche méthodologique permet de détecter des augmentations de flux qui peuvent permettre de prévenir des complications cardiovasculaires chez des sujets à risque. Ainsi, des méthodes physio-pharmacologiques consistant à évaluer la vasodilatation endothélium (in)dépendante en terme de flux par LDF couplé à la technique iontophorèse (Serne et coll, 2002; Miaadi-Messaoud et coll, 2010) ont récemment été utilisées pour mesurer des

augmentations significatives et transitoires du flux sanguin au niveau de la microcirculation cutanée en réponse à une infusion de substances vasoactives telle que l'ACh. Cette méthode technique d'investigation non invasive (utilisée en exploration clinique humaine) a été utilisée sur des sujets sains aussi bien que chez des personnes atteintes d'une pathologie affectant la régulation de la vasomotricité endothélium dépendante (Rakobowchuk et coll 2005; Morris et coll 1995). Dans une première investigation, nous avons réalisé des courbes dose-réponse obtenues par iontophorèse d'ACh.

- Lorsque l'iontophorèse d'ACh sous LDF est faite **avant** exercice:

L'état vasomoteur fut évalué en comparant les changements en FSBF à l'application cumulative de différentes concentrations d'ACh (agoniste vasodilatateur endothélium-dépendant). Depuis les expériences originales de Furchgott and Zwadezki en 1980, découvrant que les relaxations d'anneaux vasculaires induites par l'ACh et l'ADP-ATP ne peuvent se faire que si l'endothélium est présent et intact, beaucoup d'auteurs ont précisé les mécanismes sur vaisseaux isolés ou par LDF (Moncada et coll, 1993 ; VanHoutte et coll, 2003 ; Saïag et coll, 1996 ; Zguira et Al 2013). Il existe plusieurs mécanismes conduisant à la vasodilatation, ceux via des substances d'origine sanguine, ceux via des substances d'origine endothéliale et ceux via des terminaisons nerveuses.

Nos expériences montrent une augmentation du FSBF dans les groupes sédentaires et entraînés après une iontophorèse à l'ACh au repos. En fait, il est bien connu que l'ACh interagit avec des récepteurs muscariniques endothéliaux et cause la libération de NO à partir de l'endothélium. Le NO, un gaz qui diffuse dans la media et induit la relaxation des cellules

musculaires lisses. Le mécanisme via des fibres nerveuses est appelée « réflexe d'axone » et induit la vasodilatation. Il est dû à l'action de l'ACh sur des fibres C-nociceptives. L'ACh va sensibiliser les fibres C-nociceptives et provoquer une augmentation de la libération de Substance P et de Calcitonine Gene Related Peptide (CGRP). La Substance P va stimuler la libération d'histamine par les mastocytes d'où indirectement une relaxation du MLV et augmentation de la perméabilité vasculaire. CGRP induit directement une vasodilatation (Brain et coll, 2004). Ainsi, ce premier résultat de notre étude est en accord avec la littérature.

- Lorsque l'iontophorèse d'ACh sous LDF est faite **après** un simple exercice aigu:

Les données obtenues à partir de la comparaison des groupes démontrent que la réponse FSBF à la VED induite par l'ACh est significativement augmentée chez les sujets jeunes entraînés comparés aux sujets sédentaires après un simple exercice aigu. Ce résultat est en accord avec d'autres études qui montraient les effets bénéfiques de l'entraînement sur la VED (Higashi et coll, 1999; Goto et coll, 2003). Nos résultats sont originaux parce qu'ils constituent la première étude relative à de jeunes sujets (15 ± 1 an).

L'importance du shear stress comme stimulus mécanique de la libération de NO endothélial et, à suivre de vasodilatation a largement été démontré (Hambrecht et coll, 1998) et nos travaux concernent aussi ce mécanisme.

Ainsi, le fait qu'il n'y a aucune différence entre pressions systolique et diastolique et pic du rythme cardiaque ne signifie pas que la durée de soumission au shear stress soit la même chez les sédentaires et les entraînés quand VO_{2max} est atteint. En effet, les sujets entraînés (T) mettent plus de temps que les sujets sédentaires (S) pour atteindre leur VO_{2max} . Par

conséquent, les vaisseaux résistants sont soumis pendant plus longtemps au shear stress chez les sujets entraînés (T).

En conséquence, l'effet de la VED induit par le shear stress est plus important chez les sujets entraînés. Il est maintenant bien admis que l'exercice procure des effets bénéfiques sur les vaisseaux et ainsi contribuer à diminuer les effets des facteurs de risque cardiovasculaire (Johnson et coll, 2012). Bien qu'il y a un grand nombre d'évidences qui conduisent à dire que l'exercice a des effets bénéfiques sur le fonctionnement de l'endothélium, il est en effet bien connu que l'entraînement physique induit une augmentation du flux sanguin, ce qui cause une vasodilatation endothélium dépendante (Pyke et coll, 2005).

De fait, beaucoup d'études montrent que l'exercice physique améliore la fonction endothéliale via une meilleure libération et/ou biodisponibilité du NO/EDRF, une diminution du stress oxydant, une augmentation de la libération de cellules endothéliales circulantes (angiogéniques) (Jenkins et coll 2009). Laufs et coll (2004) ont montré, parmi d'autres, que l'exercice physique améliore la fonction endothéliale via une augmentation de la libération de NO par les cellules endothéliales associée à une stimulation de la NOSe. Ainsi, ils notent que la sédentarité cause une dysfonction endothéliale associée à une réduction de l'activité eNOS.

Notre troisième étude s'intéresse à évaluer, chez des femmes obèses vs un groupe témoin, les effets d'un programme de réhabilitation par un entraînement physique individualisé sur la VDE via le NO. Parallèlement les capacités aérobies et les concentrations de biomarqueurs de l'inflammation sont enregistrées.

Pour l'aspect méthodologique, l'entraînement (vélo, 2mois, 1H, 3 fois/semaine) utilisé est à 50% de la puissance maximale aérobie pour plusieurs raisons: meilleure prise en charge des sujets, effet d'émulation dont chacun peut bénéficier, efficacité chez les sujets atteints de certaines maladies respiratoires chroniques, plus adaptée à des enfants obèses, meilleure oxydation des lipides.

L'utilisation d'un test de marche de six minutes comme épreuve de terrain avant et après la période de deux mois d'entraînement est largement validée. Ce test nous a permis d'utiliser les valeurs de références et les équations correspondantes adaptées à la femme tunisienne. Ces équations permettent le calcul de la distance de marche de six minutes (DM6) à titre prédictif pendant un test standardisé. En effet, la DM6 traduit la capacité aérobie et est fonction de l'IMC et l'âge: plus la masse corporelle baisse, plus la capacité aérobie augmente. Là encore, nous avons mesuré, pour évaluer la VDE-NO, l'hémodynamique de la microcirculation cutanée par la technique du Laser Doppler associée à l'infusion iontophorétique d'ACh.

Notre étude permet une baisse significative de la masse grasse et de l'IMC. Cette baisse est plus importante dans le groupe des femmes obèses. L'augmentation de la dépense énergétique dans les conditions aérobiques que nous avons utilisées, permet une plus grande contribution des lipides à la fourniture d'énergie pendant l'exercice et donc augmente le taux maximal d'oxydation des lipides (LIPOXmax). Ainsi, la réduction de la masse corporelle, de l'IMC et de la masse grasse est significativement plus élevée chez les obèses, en accord avec d'autres études. L'utilisation d'un exercice modéré produit une augmentation de l'oxydation lipidique et s'explique par une économie des stocks de glycogène ainsi que par une capacité d'oxydation plus importante après la période d'entraînement. De plus, l'exercice en endurance modérée

augmente l'expression et l'activation de la lipase hormono sensible (HSL) et donc la lipolyse du tissu adipeux. Enfin, l'augmentation de l'oxydation des lipides améliore la sensibilité des récepteurs à l'insuline, ce qui favorise un meilleur fonctionnement de l'endothélium.

De fait, il est connu que l'obésité induit une réduction importante de la VDE-NO chez la femme. La VDE est significativement réduite chez les femmes obèses et amène à concevoir une relation entre l'obésité et la dysfonction endothéliale.

Ce dysfonctionnement peut être expliqué par:

- Les Peptides « adipocines » tels que la leptine, la résistine, le TNF α , l'IL6 dont les valeurs étaient significativement plus élevées par rapport aux femmes témoins. Un excès de masse grasse induit une réaction inflammatoire chronique par la libération anormale d'adipokines. Il existe aussi une activation des voies de signalisation pro inflammatoires à l'origine des complications cardiovasculaires. En effet, la leptine induit un stress oxydatif avec la production des radicaux libres. Cette hormone stimule la sécrétion des cytokines pro inflammatoires (TNF α et IL6) à l'origine de l'hypertension artérielle et dégrade la fonction endothéliale (Chu et coll, 2003; Bullo et coll, 2003), ce qui explique que nos femmes obèses ont des taux élevés de TNF α et d'IL6. Le TNF α provoque une insulino-résistance et altère le fonctionnement de l'endothélium vasculaire.

- SO: le stress oxydant est à l'origine d'une dysfonction endothéliale chez les sujets obèses et hypercholestérolémiques (Yukihito et coll, 2001 ; Nakao et coll, 2000 ; Jang et coll, 2001). Ainsi, les radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) agissent sur l'endothélium mais aussi stimule la croissance des cellules musculaires lisses de la média et la croissance des

fibroblastes La NAD/NADPH oxydase est une source vasculaire importante de ROS (Griendling et coll, 2003) et est corrélé à des facteurs de risques tels que l'athérosclérose et la dysfonction endothéliale (Cai et coll, 2003). Par ailleurs, l'élévation des taux des acides gras saturés augmente le SO via la NADPH oxydase. Le SO induit également une dysrégulation de la production des adipokines, laquelle est améliorée par la réduction pondérale et l'activité physique (ce point étant démontré dans notre étude). Enfin le SO piège le NO pendant sa libération endothéliale et réduit ainsi ses effets (entre autres, réduction de la vasodilatation). Enfin, comme décrit plus haut, la dysfonction endothéliale peut être expliquée aussi par le découplage NOSe/Akt et le Découplage eNOS/BH4. Ceci conduit à une production d'anions super oxyde puis de peroxynitrites (ONOO-) impliqués dans la formation des cellules spumeuses, des plaques d'athérome lors des hyperglycémies (Cosentino et coll, 1997).

Notre étude suggère fortement une nette amélioration de la fonction endothéliale ainsi qu'une amélioration du profil pro-inflammatoire, après le programme de réhabilitation basé sur l'exercice musculaire individualisé. L'amélioration de la fonction endothéliale chez les femmes obèses peut être expliquée par plusieurs modifications de la boucle physiopathologique. En effet, l'exercice à lui seul réduit la résistance à l'insuline dans le diabète et dans le syndrome métabolique, mais aussi module les concentrations d'adiponectine et de ghréline ce qui améliore directement la fonction endothéliale (Maggio et coll, 2012). Les effets de l'exercice en endurance sont directs et indirects. L'exercice améliore directement la structure et la fonction vasculaire puisqu'il garantit l'intégrité de la fonction endothéliale, diminue le stress oxydant et constitue un promoteur du développement

vasculaire au sein des muscles en activité. Les effets indirects de l'exercice cible la réduction des facteurs de risques vasculaires, notamment l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle ainsi que le diabète et la résistance à l'insuline (Conti et coll, 2013). Les études expérimentales avaient démontré une augmentation de la vasodilatation endothéliale dépendant provoquée par l'acétylcholine sur des modèles animaux (Furchgott et Zawadzki 1980). Dans le même cadre, L'entraînement physique augmente la vasodilatation endothéliale dépendant au niveau de l'avant-bras chez des hypertendus ainsi que chez des sujets sains.

L'exercice peut agir aussi sur les cellules en provenance de la moelle osseuse, en effet, les progéniteurs (endothelial progenitor cells EPCs) augmentent par l'exercice musculaire et ce paramètre peut influencer largement l'amélioration de la fonction endothéliale chez les femmes obèses après deux mois d'entraînement (Koutroumpi et coll, 2012) ce qui est cohérent avec nos résultats. Un autre résultat publié dans la littérature corrobore l'effet bénéfique de l'exercice par la baisse de l'insulinorésistance chez l'enfant et chez l'adulte obèses (Ben Ounis et coll, 2010, 2011 ; Constantin-Teodosiu et coll, 2013).

Pour conclure : La première étude montre que l'exercice intense ne peut pas « réhabiliter » le dysfonctionnement endothélial. Comme ceci a été évalué en étudiant les VEDs induites par l'ACh d'une part et l'ADP β S d'autre part. Ainsi, ces VED faibles ne sont pas réhaussées chez des rats diabétiques type1 après huit semaines d'un entraînement intense. Ces travaux amènent à recommander plutôt une activité physique modérée, en endurance pour espérer améliorer une fonction endothéliale altérée. Il est par ailleurs nécessaire de poursuivre l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la dysfonction endothéliale régulatrice de la vasomotricité. De ce fait, dans une deuxième étude clinique chez de jeunes hommes,

volontaires sains, nous observons qu'un entraînement « libre » et donc pas trop intense est bénéfique vis-à-vis de la fonction endothéliale. Les données sur la VED microvasculaire cutanée montrent que l'entraînement physique de jeunes sujets potentialise les effets vasodilatateurs de l'ACh après un exercice aigu comparativement à des sujets sédentaires. L'entraînement de jeunes hommes en bonne santé, influence significativement VED par une augmentation de la réponse du FSBF liée au shear stress et au NO/EDRF. Il sera nécessaire de poursuivre ces travaux, pour mieux comprendre les mécanismes conduisant à une potentialisation de la VED chez des sujets entraînés soumis à un exercice aigu. La Troisième étude démontre que l'entraînement physique modéré individualisé améliore significativement la fonction endothéliale régulatrice de la vasodilatation et réduit l'agression engendrée par les biomarqueurs de l'inflammation chez les femmes obèses. Les effets de ce type d'exercice individualisé sont donc à la fois directs et indirects: amélioration directe de la structure et du fonctionnement de la paroi vasculaire garantissant notamment la fonction endothéliale régulatrice de la vasodilatation ; diminution directe de l'inflammation ; indirectement réduction des conséquences des facteurs de risques tels que l'hypercholestérolémie, l'hypertension artérielle et le diabète. Il ressort de l'ensemble de nos travaux qu'il faut continuer à mieux cerner les conditions de potentialisation de la VED tant expérimentalement chez l'animal qu'en recherche clinique, non seulement pour mieux préciser les conditions d'AP les plus bénéfiques pour la fonction endothéliale tant en préventif qu'en curatif, mais aussi , afin de plus approfondir les processus moléculaires conduisant à ces effets bénéfiques. Ainsi, en termes de santé publique, de tels travaux pourraient avoir une utilité certaine. Enfin, comprendre les mécanismes d'action moléculaires d'une activité physique bénéfique pourrait

permettre d'obtenir les mêmes bénéfices chez des sujets ne pouvant pratiquer le sport en utilisant les molécules induisant ces mécanismes (avec pour risque d'encourager la sédentarité) !!!

Fiches techniques

**Fiche technique n°1 :
Identification de la population d'étude**

Modèle animal : Rat

Souche : Wistar

Sexe : mâle

Age : 9 semaines (au début de l'étude)

Provenance : élevage « Janvier » (Le Genest Saint Isle, 53 940 France)

Hébergement : animalerie

- UMR 6061 - Génétique et Développement (CNRS / Université de Rennes 1)
- validée par les services vétérinaires départementaux
- avec un rythme nuit-jour autoprogrammé de 12 heures
- température entre 20 et 22°C

Alimentation :

- croquettes produites et commercialisées par "HERSTELLER"
("special dietservice")
- eau du robinet
- alimentation et hydratation libres

Répartition des animaux dans les différents groupes d'étude :

- répartition aléatoire en 3 groupes :
 - o diabétiques (STZ)
 - o diabétiques traités à l'insuline (STZIns)
 - o non diabétiques (C)

Fiche technique n°2 :**Induction du diabète**

Le modèle animal de diabète est induit
Chimiquement par injection de **streptozotocine (STZ)**.

Action de cette substance chimique : action
diabéto-gène en détruisant de manière sélective les
cellules β des îlots de Langerhans du pancréas.

Induction du diabète par la STZ chez le rat :

- modèle élaboré par Portha en 1974
- développement d'un syndrome clinique
caractérisé par une hyperglycémie, une
diurèse osmotique excessive et une perte de
poids, similaire au diabète humain
- développement de complications
microvasculaires chroniques (néphropathie,
neuropathie périphérique et autonome)
comme observées chez les patients
diabétiques.

L'induction du diabète est réalisée par **injection**
intrapéritonéale de STZ diluée avec du tampon
citrate.

Les rats contrôles reçoivent une injection de tamponcitrate seul.

préparation de l'acide citrique :

Poids moléculaire (PM) = 192.12

Pour obtenir 50 mL d'acide citrique à
[100 mM] : peser 0,96g et ajouter de
l'eau Ultrapure (UpH20) jusqu'à 50
mL

Fiche technique n°3 : Vérification du diabète

L'action de la STZ sur les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas est accompagnée par des **altérations caractéristiques des concentrations sanguines d'insuline et de glucose.**

L'injection de STZ conduit finalement à une **hyperglycémie chronique** et à une diminution de la concentration sanguine en insuline.



Glucomètre

Confirmation du diabète :

- 72 heures après l'injection de STZ
- [glucose]_{sanguine} mesurée au niveau de la queue $> 250 \text{ mg.dL}^{-1}$ à l'aide d'un glucomètre
- détection de corps cétoniques par le glucomètre ou par des bandelettes urinaires
- perte de poids



Bandelettes urinaires

Références matériels :

Glucomètre MediSense Optium

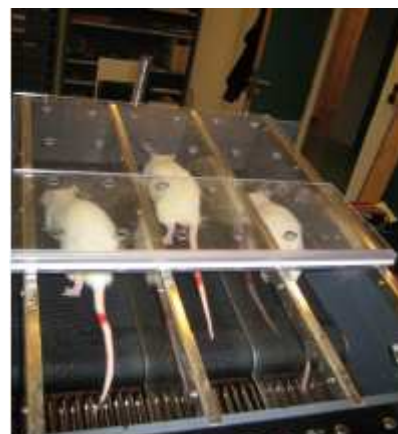
Bandelettes urinaires Keto-Diastix® -

Bayer Diagnost

Fiche technique n°4 : Protocole d'entraînement physique

Organisation :

- Familiarisation des animaux durant une semaine à l'animalerie puis placement aléatoire dans les groupes sédentaires et entraînés
- Entraînement sur tapis roulant
- Réalisation de toutes les sessions d'entraînement au même moment de la journée, le matin
- Début du protocole d'entraînement une semaine jour pour jour après l'injection de STZ aux rats des groupes diabétiques



Protocole :

En accord avec la littérature, l'entraînement consiste en une **course continue d'intensité et de durée progressive** divisée en 3 périodes (Broderick et coll. 2005). Son intensité (durée et vitesse) est augmentée progressivement, la pente du tapis restant fixe sur toute la durée du protocole d'entraînement.

- 8 semaines d'entraînement, à raison de 5 jours par semaine
- pente de 10°
- 1^{ère} période : 2 semaines avec pour objectif final 10 min à 20 m/min
- 2^{ème} période : 3 semaines → 40 min à 22 m/min
- 3^{ème} période : 3 semaines → 60 min à 25 m/min

Entraînement des rats sur tapis

Roulant

Compte-rendu de séance pour chaque rat :

- Date
- Durée de la course
- Vitesse et pente du tapis
- Poids
- Appréciations sur la qualité de la séance

Fiche technique n°5 : Suivi des animaux au cours de l'étude Sacrifice

Contrôle du poids :

- Pésée sur une balance classique de tous les



animaux le matin avant la séance d'entraînement
des animaux des groupes entraînés.

But :

- Contrôler régulièrement l'état physique des animaux et leur tolérance à l'entraînement
- Comparer l'évolution des masses corporelles des rats sédentaires et entraînés, et des rats diabétiques et non diabétiques.
- Contrôler l'état du diabète chez les animaux diabétiques.

Sacrifice :

- Anesthésie réalisée 24h après la dernière session d'entraînement pour les animaux entraînés
- Anesthésie par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodium (50 mg/kg)
- Disposition particulière pour l'étude de la fonction contractile du myocarde par la technique du coeur isolé-perfusé : au moment de l'anesthésie, injection intrapéritonéale d'héparine (500 U/kg) afin de rendre le sang incoagulable

Références médicaments :

Pentobarbital Sodique : Ceva Santé Animale Héparine Choay 1F1 5mL

Fiche technique n°6: Mesure de l'activité de la citrate synthase

La mesure de l'activité de la **citrate synthase (CS)**, enzyme du cycle de Krebs, permet de vérifier et d'attester de l'efficacité du programme d'entraînement sur le potentiel aérobie.

Au moment des prélèvements, soit 24h après la dernière session d'entraînement, les gastrocnémiens, muscles squelettiques de la patte postérieure sont prélevés, congelés dans de l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Protocole de mesure:

- Homogénéiser, à l'aide du polytron, les échantillons tissulaires (environ 200 mg) dans le tampon d'homogénéisation (TH) (dilution au 1/10), contenant un cocktail d'antiprotéases.

L'opération se réalise dans un tube à hémolyse, en 20 secondes à 30 000 tr/min.

- Sonifier l'homogénat 60 sec à 50 Hz

- Centrifuger l'homogénat 13 min à 1 500 G, 4°C

- Prélever le surnageant et réaliser des aliquots

- Stocker les aliquots à -80°C

Composition du tampon

d'homogénéisation pH 7,5 :

- Solution 1 :

(Na₂HPO₄ 0,1 M, EDTA 2 mM)

_ Na₂HPO₄ _ 14,2 g

_ EDTA _ 0,744g

_ QSP H₂O _ 1L

- Solution 2 :

(NaH₂PO₄, H₂O 0,1 M, EDTA 2 mM)

_ NaH₂PO₄, H₂O _ 2,76 g

_ EDTA _ 0,1488g

_ QSP H₂O _ 200 mL

-Tampon d'homogénéisation :

_ Solution 1

_ QSP solution 2, pH 7,5

Références produits : EDTA : VWR 33

600.267. Na₂HP04 : Sigma S 0876

NaH₂PO₄, H₂O: Sigma S 9638

Cocktail d'antiprotéases : Roche

Fiche technique n°7 Préparation du réactif de Krebs

Le réactif de Krebs est un **réactif physiologique** utilisé pour préserver les propriétés et l'intégrité fonctionnelle de la paroi vasculaire lors des manipulations de vaisseaux isolés en cuve.

Ce milieu contient tous les éléments nécessaires à la survie des vaisseaux *ex vivo*.

Ce réactif qui constitue le milieu de survie est une **solution ionique de Krebs-Henseleit modifiée et tamponnée** par du bicarbonate (pour la stabilité de la préparation). Cette solution de pH 7,4 est équilibrée avec un mélange d'oxygène (95%) et de gaz carbonique (5%) puis filtrée. La solution de Krebs-Henseleit doit être fraîchement faite, filtrée, oxygenée et chauffée à 37°C dans la cuve.

Préparation du réactif de Krebs :

Pour obtenir 5 L de solution de Krebs-

Henseleit pH 7,4 ;

- diluer dans 5L d'H₂O distillée :

-34,52g de NaCl

-1,75g de KCl

-0,55g de MgSO₄

-0,8g de KH₂PO₄

-10,5g de NaHCO₃

-9,9g de glucose

-contrôler le pH

-oxygener la solution

-y ajouter 1,11g de CaCl₂

-contrôler le pH

Concentration et rôle des molécules composant le réactif de Krebs

Molécules	[C] (mM)	Rôle
NaCl	118	Rôle majeur dans l'osmolarité et dans le maintien du potentiel de membrane
KCl	4.7	Permet de maintenir la différence de potentiel de membrane en maintenant la concentration intracellulaire d'ions K ⁺
CaCl ₂	1.9	indispensable à la contraction musculaire et cofacteur enzymatique important
MgSO ₄	1.2	L'ion Mg ²⁺ est cofacteur enzymatique important
KH ₂ PO ₄	1.2	Tampon acido-basique
NaHCO ₃	25	Tampon acido-basique, le pH final est de 7,4
Glucose	11	Source d'énergie

BIBLIOGRAPHIE

A-

Aggoun Y, Farpour-Lambert NJ, Marchand LM, Golay E, Maggio AB, Beghetti M. (2008) Impaired endothelial and smooth muscle functions and arterial stiffness appear before puberty in obese children and are associated with elevated ambulatory blood pressure. *Eur Heart J.* Mar;29(6):792-9

Alberti KG, Zimmet PZ (1998). New diagnostic criteria and classification of diabetes again ? *Diabet Med.* Jul;15(7):539-53.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J.* Aug 1;357(Pt 3):593-615

Anderson, T.J. (2003). Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart. Fail. Rev.* 8 (1) : pp 71-86.

Annuk M, Zilmer M, Lind L, Linde T, Fellström B. (2001) Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol.* Dec;12(12):2747-52.

Armstead, V.E., Minchenko, A.G., Schuhl, R.A. Hayward, R., Nossuli, T.O. and Lefer, A.M. (1997). Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am. J. Physiol.* 273 : pp H740-H7

Arshad SH, Hamilton RG, Adkinson NF Jr. (1998) Repeated aerosol exposure to small doses of allergen. A model for chronic allergic asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* Jun;157(6 Pt 1):1900-6

Avogaro, A., Fadini, G.P., Gallo, A., Pagnin, E. and De Kreutzenberg, S. (2006) Endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* 16 : pp S39-S45.

Avogaro A (2006) Insulin resistance: trigger or concomitant factor in the metabolic syndrome. *Panminerva Med.* 2006 Mar;48 (1):3-12

B-

Bakker WW, Henning RH, van Son WJ, van Pampus MG, Aarnoudse JG, Niezen-Koning KE, Borghuis T, Jongman RM, van Goor H, Poelstra K, Navis G, Faas MM. . (2009) Vascular contraction and preeclampsia: downregulation of the Angiotensin receptor 1 by hemopexin in vitro. *Hypertension* Jun;53(6):959-64

Behrendt D, Ganz P. (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* Nov 21;90(10C)

Bennett SJ, Puntenney PJ, Walker NL, Ashley ND. (1996) Development of an instrument to measure threat related to cardiac events. *Nurs Res.* Sep-Oct;45(5):266-70.

Ben Ounis O, Elloumi M, Zouhal H, Makni E, Lac G, Tabka Z, Amri M. Effect of an individualized physical training program on resting cortisol and growth hormone levels and fat oxidation during exercise in obese children. *Ann Endocrinol (Paris)* 2011; 72(1):34-41.

Best PJ, Lerman LO, Romero JC, Richardson D, Holmes DR Jr, (1999) Lerman A. Coronary endothelial function is preserved with chronic endothelin receptor antagonism in experimental hypercholesterolemia in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* ;19(11):2769

Blair SN, Haskell WL. Objectively measured physical activity and mortality in older adults. *JAMA.* 2006 Jul 12;296(2):216-8

Bourgoin M, Ouellette NT, Xu H, Berg J, Bodenschatz E (2006) The role of pair dispersion in turbulent flow. *Science*. 10;311(5762):835-8.

Brandou F, Dumortier M, Garandeau P, Mercier J, Brun JF (2003) Effects of a two-month rehabilitation program on substrate utilization during exercise in obese adolescents. *Diabetes Metab*. 29(1):20-7.

Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, Kiowski W, Lüscher TF, Mancia G, Natali A, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Spieker LE, Taddei S, Webb DJ; Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. (2005) Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. Feb;23(2):233-46

Burnett JR, Hooper AJ. (2008) Common and rare gene variants affecting plasma LDL cholesterol. *Clin Biochem Rev*.

Burnstock G (1990) Local mechanisms of blood flow control by perivascular nerves and endothelium. *J Hypertens Suppl*. 8(7):S95-106

Busse, R. and Fleming, I. (1995). Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann. Med*. 27 : pp 331-340.

C-

Camilleri, J.P., Berry, C.L., Fiessinger, J.N. and Bariéty, J. (1987). Les maladies de la paroi artérielle. p 2. Médecine-Sciences Flammarion. Paris.

Carson WE, Caligiuri MA (1996) Interleukin 15: a potential player during the innate immune response to infection. *Exp Parasitol.* Nov;84(2):291-4.

Casillas JM, Gremeaux V, Damak S, Feki A, Pérennou D. (2007) Exercise training for patients with cardiovascular disease. *Ann Readapt Med Phys.* Jul;50(6):403-18, 386-402

Casteilla L, Charrière G, Laharrague P, Cousin B, Planat-Benard V, Péricaud L, Chavoïn JP. (2004) Adipose tissue, plastic and reconstructive surgery: come back to sources. *Ann Chir Plast Esthet* 49(5):409-18.

Chen GN, Liu JS, Duan JP, Chen HQ. (2000) Coulometric detector based on porous carbon felt working electrode for flow injection analysis. *Talanta.* Dec 4;53(3):651-60

Chen, S.T., Maruthur, N.M. & Appel, L.J (2010) The Effect of Dietary Patterns on Estimated Coronary Heart Disease Risk: Results From the Dietary Approaches to Stop Hypertension Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 3(5):484-9

Christopherson KS, Brecht DS.(1997) Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest.* Nov 15;100(10):2424-9

Cohen E, Sheinin D, Rath E, Szendro G. (2008) Nailing before vascular repair in tibial fracture with associated arterial injury. *Orthopedics.* Feb;31(2):171

Clarkson P, Montgomery HE, Mullen MJ, Donald AE, Powe AJ, Bull T, Jubbs M, World M, Deanfield JE. (1999) Exercise training enhances endothelial function in young men. *J Am Coll Cardiol* Apr;33(5):1379-85.

Collin, S. and Levy, B. (2008). Physiopathologie de l'hyporéactivité vasculaire au cours des états de choc. *Réan.* 17 : pp 101-110.

Collin S, Sennoun N, Levy B. (2008) Cardiovascular and metabolic responses to catecholamine and sepsis prognosis: a ubiquitous phenomenon? *Crit Care.* ;12(2):118.

Cornelissen VA, Fagard RH (2005) . Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertension.* Oct;46(4):667-75.

Communi D, Motte S, Boeynaems JM, Piroton S. (1996) Pharmacological characterization of the human P2Y₄ receptor. *Eur J Pharmacol.* Dec 19;317(2-3):383-9.

Cordellini S. (1999) Endothelial dysfunction in DOCA-salt hypertension: possible involvement of prostaglandin endoperoxides. *Gen Pharmacol.* Mar;32(3):315-20.

Correia ML, Haynes WG. Leptin, (2004) Obesity and cardiovascular disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* Mar;13(2):215-23.

Cromwell WC. (2007) High-density lipoprotein associations with coronary heart disease: Does measurement of cholesterol content give the best result? *J Clin Lipidol.* Dec;1(6):583-92.

D-

Delp MD, Behnke BJ, Spier SA, Wu G, Muller-Delp JM. (2008) Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. *J Physiol* Feb 15;586(4):1161-8..

De Nucci G, Warner T, Vane JR. Hirata (1993) Effect of captopril on the bradykinin-induced release of prostacyclin from guinea-pig lungs and bovine aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* Nov;95(3):783-8

DeSouza CA, Shapiro LF, Clevenger CM, Dinunno FA, Monahan KD, Tanaka H, Seals DR: (2000) Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men. *Circulation*, 102:1351–

Devaraj S, Yun JM, Adamson G, Galvez J, Jialal I. (2009) C-reactive protein impairs the endothelial glycocalyx resulting in endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.*1;84(3):479-84..

Diederich CJ, Hynynen K. (1990) The development of intracavitary ultrasonic applicators for hyperthermia: a design and experimental study. *Med Phys.*17(4):626-34.

Dinh-Xuan, A.T. (1996) Biologie, physiologie et pharmacologie du monoxyde d'azote. *Réan. Urg.* 5 (6) : pp S47-S49.

Dinh-Xuan, A.T., Barouxis, C., Thi-Van, N., Lan, N.H. and Texereau, J. (1998) Monoxyde d'azote (NO) et asthme. *Rev. Fran. Allergol. Immunol. Clin.* 38 (3) : pp 165-174.

Domenico R, (2004) Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies. *Curr Pharm Des.* 10(14):1667-76.

Drury et Szent-Györgyi. (1929) The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68(3): 213-37

Duda K, Chi YI, Shoelson SE. (2004) Structural basis for HNF-4alpha activation by ligand and coactivator binding. *J Biol Chem.* 279(22):23311-6

E-

Endemann DH, Schiffrin EL: (2004) Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, 15:1983–92.

Epstein LH, Paluch RA, Coleman KJ, Vito D, Anderson K. (1996) Determinants of physical activity in obese children assessed by accelerometer and self-report. *Med Sci Sports Exerc.* 28(9):1157-64.

Esteban, F.J., Pedrosa, J.A., Jiménez, A., Fernández, A.P., Bentura, M.L., Martínez-Murillo, R.. (1997). Distribution of neuronal nitric oxide synthase in the rat liver. *Neurosci. Lett.* 226 (2) : 99-102.

F-

Favre J, Musette P, Douin-Echinard V, Laude K, Henry JP, Arnal JF, Thuillez C, Richard V.(2007) Toll-like receptors 2-deficient mice are protected against postischemic coronary endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (5):1064-71

Fawcett, Don W. and Jensh, R.P. (2002). *Histologie, L'essentiel.* pp : 199-200. Maloine.

Fernhall B, Agiovlasitis S. (1985). Arterial function in youth: window into cardiovascular risk. *J Appl Physiol* 2008 Jul ; 105(1): 325-33.

Ferri C, Bellini C, De Angelis C, De Siati L, Perrone A, Properzi G, Santucci A. (1995) Circulating endothelin-1 concentrations in patients with chronic hypoxia. *J Clin Pathol.* 48(6):519-24.

Fève B, Bastard JP, Vidal H. (2006) Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts. *C R Biol.* Aug;329(8):587-97

Furchgott RF (1996) The Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA.* 276(14):1186-8.

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288:373–6.

G-

Ghiadoni L, Virdis A, Magagna A, Taddei S, Salvetti A. (2000) Effect of the angiotensin II type 1 receptor blocker candesartan on endothelial function in patients with essential hypertension. *Hypertension.* (1 Pt 2):501-6.

Golbidi S & Laher I, (2013) Exercise and the aging endothelium. *J Diabetes Res.* 789607.

Goodfellow J, Owens D, Henderson A. (1996) Cardiovascular syndromes X, endothelial dysfunction and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract. Suppl:*S163-71

Goto C, Higashi Y, Kimura M, Noma K, Hara K, Nakagawa K, Kawamura M, Chayama K, Yoshizumi M, Nara I. (2003) Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*, 108(5):530-5.

Grasser WA, Orlic I, Borovecki F, Riccardi KA, Simic P, Vukicevic S, Paralkar VM. (2007) BMP-6 exerts its osteoinductive effect through activation of IGF-I and EGF pathways. *Int Orthop*. 31(6):759-65.

Griendling KK, FitzGerald GA (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation*. 28;108(17):2034-40. Review.

Grimaldi S, Englund A, Partonen T, Haukka J, Pirkola S, Reunanen A, Aromaa A, Lönnqvist J. (2009) Experienced poor lighting contributes to the seasonal fluctuations in weight and appetite that relate to the metabolic syndrome. *J Environ Public Health*.

H-

Hambrecht, R., Adams, V., Erbs, S., Linke, A., Krankel, N., Shu, Y. et al. 2003. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. **107** : pp 3152-3158.

Hamdy RC (2003) Obesity: an epidemic *South Med J*. Jun; 96(6):531-2

Hannukainen JC, Janatuinen T, Toikka JO, Jarvisalo MJ, Heinonen OJ, Kapanen J, Nägren K, Nuutila P, Kujala UM, Kaprio J, Knuuti J, Kalliokoski KK. (2007) Myocardial and

peripheral vascular functional adaptation to exercise training. Scand J Med Sci Sports. Apr;17(2):139-47.

Halimi JM, Lebranchu Y (2000) Regulation and dysfunction of endothelium-dependent vasomotricity. What can be applied to clinical practice? Presse MedDec 9;29(38):2109-15. Review.

Harris HR, Tamimi RM, Willett WC, Hankinson SE, Michels KB. (2011) Body size across the life course, mammographic density, and risk of breast cancer. Am J Epidemiol. 15;174(8):909-18.

Hasdan G, Benchetrit S, Rashid G, Green J, Bernheim J, Rathaus M. (2002) Endothelial dysfunction and hypertension in 5/6 nephrectomized rats are mediated by vascular superoxide. Kidney Int.;61(2):586-90.

Hayashi, T. et al. (2003).Visceral adiposity and the prevalence of hypertension in Japanese Americans. *Circulation* 108, 1718-1723

Heitzer, T., Brockhoff, C., Mayer, B., Warnholtz, A., Mollnau, H., Henne, S (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. Circ. Res. 86 : pp 36-41

Haram PM, Adams V, Kemi OJ, Brubakk AO, Hambrecht R, Ellingsen O, Wisløff U. (2006)Time-course of endothelial adaptation following acute and regular exercise.Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. Aug;13(4):585-91

Heylen E, Guerrero F, Mansourati J, Theron M, Thioub S, Saïag B. (2008) Effect of training frequency on endothelium-dependent vasorelaxation in rats. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. Feb;15(1):52-8

Heyman E, Toutain C, Delamarche P, Berthon P, Briard D, Youssef H, Dekerdanet M, Gratas-Delamarche A. (2007) Exercise training and cardiovascular risk factors in type 1 diabetic adolescent girls. *Pediatr Exerc Sci*. Nov;19(4):408-19.

Hörning B. (1998) Animal rights and animal health on ecological farms. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 105(8):313-21.

Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M. & Kihara, Y. (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ. J* 73, 411-418

Hilaire-Buys D, Peyriere H, Linck N, Saïag B (2003) Dysfonctionnement endothelial et diabète: aspect fondamentaux et perspectives thérapeutiques. *Angéiologie*. Vol 55 :2, 33-40

I-

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*.61(6):866-79

J-

Joannides R, Costentin A, Iacob M, Bakkali el-H, Richard MO, Thuillez C. . (2001) Role of arterial smooth muscle tone and geometry in the regulation of peripheral conduit artery mechanics by shear stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28(12):1025-31.

John, S. and Schmieder, R.E. (2003). Potential mechanisms of impaired endothelial function in arterial hypertension and hyper-cholesterolemia. *Curr. Hypertens*

Juan CC, Fang VS, Hsu YP, Huang YJ, Hsia DB, Yu PC, Kwok CF, Ho LT. (1998) Overexpression of vascular endothelin-1 and endothelin-A receptors in a fructose-induced hypertensive rat model. *J Hypertens.* 6 : 1775-82.

K-

Kahle B, Hummel S, Deichmann M, Petzoldt D. (2000) Determining the severity of venous insufficiency with duplex sonography. *Hautarzt.* (2):70-4. German.

Kapur,S., Bédard, S., Marcotte, B., Côté, C.H. and Marette, A.(1997). Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes.* 46 :1691-1700.

Kim J, Nakatani S, Hashimura K, Komamura K, Kanzaki H, Asakura M, Asanuma H, Kokubo Y, Tomoike H, Kitakaze M. (2006) Abnormal glucose tolerance contributes to the progression of chronic heart failure in patients with dilated cardiomyopathy. *Hypertens Res.* (10):775-82.

Koller MR, Bradley MS, Palsson BO. (1995) Growth factor consumption and production in perfusion cultures of human bone marrow correlate with specific cell production. *Exp Hematol.* (12):1275-83.

L-

Lajoix, A.D., Reggio, H., Chardès, T., Peraldi-Roux, S., Tribillac, F., Roye, M. (2001). Aneuronal isoform of nitric oxide synthase expressed in pancreatic β -cells controls insulin secretion. *Diabetes*. 50 : 1311-1323

Lazzer S, Meyer F, Meyer M, Boirie Y, Vermoret M. [Assessment on the usual physical activity in overweight and obese adolescents]. *Presse Med*. 2004 Oct 23;33(18):1255-9.

Lee S, Barbanel G, Rivier C. (1995) Systemic endotoxin increases steady-state gene expression of hypothalamic nitric oxide synthase: comparison with corticotropin-releasing factor and vasopressin gene transcripts. *Brain Res*;705(1-2):136-48.

Leung FP, Yung LM, Laher I, Yao X, Chen ZY, Huang Y. (2008) Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (Part 1). *Sports Med*. ;38(12):1009-24

Libby P, Plutzky J. (2002) Diabetic macrovascular disease: the glucose paradox? *Circulation*. 26;106(22):2760-3

Lim SS, Norman RJ, Davies MJ, Moran LJ. (2013) The effect of obesity on polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 14(2):95-109

Linder H, Engberg I, van Kooten C, de Man P, Svanborg-Edén C. (1990) Effects of anti-inflammatory agents on mucosal inflammation induced by infection with gram-negative bacteria. *Infect Immun*;58(7):2056-60.

Lüscher TF, (1997) Barton M. Biology of the endothelium *Clin Cardiol*. 20(11 Suppl 2):II-3-10. Review.

Lüscher TF. (1992) Endothelin: systemic arterial and pulmonary effects of a new peptide with potent biologic properties. *Am Rev Respir Dis.* 146(5 Pt 2):S56-60.

M-

Maiorana A, O'Driscoll G, Dembo L, Goodman C, Taylor R, Green D: (2001) Exercise training, vascular function, and functional capacity in middle-aged subjects. *Med Sci Sports Exerc*, 33:2022–8.

Maiorana, A., O'Driscoll, G., Cheetham, C., Dembo, L., Stanton, K., Goodman, C. et al. 2001. The effect of combined aerobic and resistance exercise training on vascular function in type 2 diabetes. *J. Am. Coll. Cardiol.* **38** : 860-866.

Marcelo KL, Goldie LC, Hirschi KK. (2013) Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circ Res.* 26;112(9):1272-87

Marieb, N.E. (2005). *Anatomie et physiologie humaines.* 733. Pearson Education. France.

Marti CN, Gheorghiade M, Kalogeropoulos AP, Georgiopoulou VV, Quyyumi AA, Butler J. (2012) Endothelial dysfunction, arterial stiffness, and heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 16;60(16)

Mathers CD, Loncar D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 2006 Nov;3(11):e442.

Mayaudon H, Dupuy O, Belmejdoub G, Bredin C, Rivetta F, Avaro JF, Bauduceau B. (2000) Effect of the type of diabetes on the prognosis over 4 years of arterial blood pressure. Arch Mal Coeur Vaiss. Aug;93(8):1029-32.

McAllister RM, Laughlin MH. (1997) Short-term exercise training alters responses of porcine femoral and brachial arteries. J Appl Physiol May;82(5):1438-44.

Melikian AA, Chen KM, Li H, Sodum R, Fiala E, El-Bayoumy K. (2008) The role of nitric oxide on DNA damage induced by benzene metabolites. Oncol Rep.19(5):1331-7.

Miâdi-Messaoud H, Chouchane A, Abderrazek E, Debbabi H, Zaouali-Ajina M, Tabka Z, Ben-Jebria A. (2010) Obesity-induced impairment of endothelium-dependent vasodilation in Tunisian women. Int J Obes (Lond). 34(2):273-9

Michael, E., Noyan, G., John, F.K. and Joseph, A. (2003). The clinical implications of endothelial dysfunction. J. Am. College. Cardiol. 42 (7) : 1149-1159.

Michael EJ, Singh B. (2003) Mixed signals from Kerala's improving health status. J R Soc Promot Health. 123(1):33-8. Review.

Michel JB. (1998) Role of endothelial nitric oxide in the regulation of the vasomotor system. Pathol Biol (Paris). 46(3):181-9. Review

Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J, Burnstock G. (1990) Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. Proc Biol Sci. 241(1302):245-8

Moncada S, Higgs A, (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med. 30; 329(27)

Moncada S, Higgs EA. (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest.* 21(4):361-74

Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43 : 109-142.

Montagnani M, Golovchenko I, Kim I, Koh GY, Goalstone ML, Mundhekar AN, Johansen M, Kucik DF, Quon MJ, Draznin B. (2002) Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances mitogenic actions of insulin in endothelial cells. *J Biol Chem.* Jan 18;277(3):1794-9.

Mungrue, I.N., Husain, M. and Stewart, D.J. (2002). The role of NOS in heart failure: lessons from murine genetic models. *Heart. Fail. Rev.* 7 : 407-422.

N-

Naderali, E.K., Brown, M.J., Pickavance, L.C., Wilding, J.P.H., Doyle, P.J. and Williams, G. (2001). Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clinical. Science.* 101 : 499–506.

Nakane, M., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Forstermann, U., and Murad, F. (1993). Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS. Lett.* 316 : 175-180

O-

Olukman M, Sezer ED, Ulker S, Sözmen EY, Cınar GM. (2010) Fenofibrate treatment enhances antioxidant status and attenuates endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Diabetes Res.* ;2010:828531

P-

Pedrono F, Martin B, Leduc C, Le Lan J, Saïag B, Legrand P, Moulinoux JP, Legrand AB. (2004) Natural alkylglycerols restrain growth and metastasis of grafted tumors in mice. *Nutr Cancer.* ;48(1):64-9.

Pellegrin, M., Mazzolai, L., Berthelt, A. and Laurant, P. (2008). Dysfonction endothéliale et risque cardiovasculaire. L'exercice protège la fonction endothéliale et prévient la maladie cardiovasculaire. *Sci. Sports.* 1-11.

Peng H, Han SH, Liu HY, Chandni V, Cai XQ, Zhang YH. (2013) Relationship of inflammation and endothelial dysfunction with risks to cardiovascular disease among people in Inner Mongolia of China. *Biomed Environ Sci* ;26(10):792-800.

Perreault, M. and Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat. Med.* 7 : pp 1138-1143.

Pilon G, Dallaire P, Marette A. (2004) Inhibition of inducible nitric-oxide synthase by activators of AMP-activated protein kinase: a new mechanism of action of insulin-sensitizing drugs. *J Biol Chem.* 279(20):20767-74

Pitre C., Cardon A, Staerman F, Prioux G, Saiag B. (1998) Endothéliopathies et approches thérapeutiques appliquées à la vasomotricité: actualités et perspectives. *Sang-Thrombose-Vaisseaux (STV)*, vol. 1, 20-28, Review

Poredos P. (2002) Endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* Sep-Dec;32(5-6):274-7. Review

R-

Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y (2013) The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci.*;9(10):1057-69

Raji A, Williams JS, Hopkins PN, Simonson DC, Williams GH. (2006) Familial aggregation of insulin resistance and cardiovascular risk factors in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* ;8(11):791-6.

Reid, L. (2006). Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J. Clin. Hypertens.* 8 : 30- 39.

Roberts AC, Porter KE. (2013) Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* ;10(6):472-82

Robinson JG, Ballantyne CM, Hsueh WA, Rosen JB, Lin J, Shah AK, Tomassini JE, Lowe RS, Tereshakovec AM. (2013) Age, abdominal obesity, and baseline high-sensitivity C-reactive protein are associated with low-density lipoprotein cholesterol, non-high-density

lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein B responses to ezetimibe/simvastatin and atorvastatin in patients with metabolic syndrome. *J Clin Lipidol.* Jul-Aug;7(4):292-303

Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Branwood AW, Grishman A. (1972) New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol.* Nov 8;30(6):595-602

S-

Sacco S, Ripa P, Grassi D, Pistoia F, Ornello R, Carolei A, Kurth T. (2013) Peripheral vascular dysfunction in migraine: a review. *J Headache Pain.* 1;14(1):80. doi: 10.1186/1129-

Saïag B, Hillaire-Buys D, Chapal J, Petit P, Pape D, Rault B, Allain H, Loubatières-Mariani MM. (1996) Study of the mechanisms involved in adenosine-5'-O-(2-thiodiphosphate) induced relaxation of rat thoracic aorta and pancreatic vascular bed. *Br J Pharmacol.* Jun;118(3):804-10

Saïag B, (2009) in « Physiologie Humaine » ; chapitre « mécanismes de contrôles des rayons vasculaires » : 164-170. Editions Pradel.

Saïag B, Shacoori V, Bodin P, Catheline M, Pape D, Alain H, Burnstock G: (1999) Pharmacological evidences for free radical implications in endothelium dependent hypoxic responses of the rat thoracic aorta. *Eur J Pharmacol*, 372:57–63.

Saïag B, Guerrero F, Stearman F, Pitré C, Catheline M, Heylen E, Pedrono F, Legrand A, Mansourati J, Hillaire-Buys D. (2004) Endothelium, paroi vasculaire et approches thérapeutiques appliquées à la vasomotricité. *Angéologie*.,56,3, 31-41. Review

Sarr, M. (2004). Modulation de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO) en physiopathologie vasculaire : intérêt des stocks mobilisables de NO et des antioxydants naturels. Thèse en Médecine. France.

Sekiguchi F, Yamamoto K, Matsuda K, Kawata K, Negishi M, Shinomiya K, Shimamura K, Sunano S. (2002) Endothelium-dependent relaxation in pulmonary arteries of L-NAME-treated Wistar and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Smooth Muscle Res* ;38(4-5):131-44.

Sessa WC. . (1994) The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* May-Jun;31(3):131-43. Review.

Sévigny G, Joly EC, Bibor-Hardy V, Lemieux N. (1994) Assignment of the human homologue of the mTRiC-P5 gene (TRIC5) to band 1q23 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. Aug;22(3):634-6.

Shah, V., Haddad, F.G., Garcia-Cardena, G., Frangos, J.A., Mennone, A., Groszmann, R.J. (1997). Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J. Clin. Invest.* 100 : 2923-2930.

Sobey CG, Faraci FM. (2001) Novel mechanisms contributing to cerebral vascular dysfunction during chronic hypertension. *Curr Hypertens Rep.* Dec;3(6):517-23

Sobrevia L, Mann GE. (1997) Dysfunction of the endothelial nitric oxide signalling pathway in diabetes and hyperglycaemia. *Exp Physiol* May;82(3):423-52.

Stankevicius E, Martinez AC, Mulvany MJ, Simonsen U. Yang (2004) Blunted acetylcholine relaxation and nitric oxide release in arteries from renal hypertensive rats. *J Hypertens*;20(8):1571-9.

Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. (2003) Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors]. *Medicina (Kaunas)*. 39(4):333-41. Review

Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P.L., Fishman, M.C. et al. (1996). Longterm potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*. 87 : 1015-1023.

Steinberg, H.O., Chaker, H., Leaming, R., Johnson, A., Brechtel, G. and Baron, A.D. (1996). Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 97 (11) : 260-310.

Sun DL, Wang JH, Jiang B, Li LS, Li LS, Wu L, Wu HY, He Y. (2012) Metabolic syndrome vs. its components for prediction of cardiovascular mortality: A cohort study in Chinese elderly adults. *J Geriatr Cardiol* Jun;9(2):123-9.

T-

Taddei, S., Ghiadoni, L., Virdis, A., Versari, D. & Salvetti, A. (2003). Mechanisms of endothelial dysfunction: clinical significance and preventive non-pharmacological therapeutic strategies. *Curr. Pharm. Des* 9, 2385-2402

Takahashi H, Saitoh S, Takagi S, Shimamoto K. [Prognosis predictor of chronic-stage acute myocardial infarction]. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 1999 Oct;36(10):721-9.

Takeda S, Inada Y, Nakamizo N, Nomura N, Tomaru T, Negishi H, Hosoyamada A. (1991) A comparison of the endocrine effects of hypotension induced by nicardipine with those by sodium nitroprusside in dogs. Masui. 40(7):1063-9

Tanriverdi H, Evrengul H, Tanriverdi S, Turgut S, Akdag B, Kaftan HA, Semiz (2005) Improved endothelium dependent vasodilation in endurance athletes and its relation with ACE I/D polymorphism. E.Circ J. 69(9):1105-10.

Tarig, A.M.A., Elhadd, T., Pfeifer, M. and Clayton, R.N. (2001). Endothelial dysfunction in Endocrine disease. Endocrinol. Metabol. 12 (6) : 257-265

Traverso JM, Ravaglia MA, Vissio PG, Maggese MC, Paz DA (2003). Localization of Neuropeptide Y-like immunoreactive structures in the brain of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Teleostei, Atheriniformes). Anat Histol Embryol. 32(1):29-35.

V-

Vallance P. (2001) Importance of asymmetrical dimethylarginine in cardiovascular risk. Lancet. 29;358(9299):2096-7.

Van Belle E, Maillard L, Tio FO, Isner JM. A (1997) Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. Biochem Biophys Res Commun.

Vane JR, Moncada S (1980) The anti-thrombotic effects of prostacyclin. Acta Med Scand Suppl. ;642:11-22

Vanhoutte P, (2013) MMP-7 and cardiovascular disease: not so surprising! Basic Clin Pharmacol Toxicol. Jan;112(1):2

Varin R, Mulder P, Richard V, Tamion F, Devaux C, Henry JP, Lallemand F, Lerebours G, Thuillez C. (1999) Exercise improves flow-mediated vasodilatation of skeletal muscle arteries in rats with chronic heart failure. Role of nitric oxide, prostanoids, and oxidant stress. *Circulation*. Jun 8;99(22):2951-7.

Vaziri ND, Wang XQ, Ni ZN, Kivlighn S, Shahinfar S.(2002) Effects of aging and AT-1 receptor blockade on NO synthase expression and renal function in SHR. *Biochim Biophys Acta*. 21;1592 (2):153-61.

Vercauteren M, Remy E, Devaux C, Dautreux B, Henry JP (2006) Improvement of peripheral endothelial dysfunction by protein tyrosine phosphatase inhibitors in heart failure. *Circulation*. 5;114(23):2498-507.

Verge CF, Gianani R, Kawasaki E, Yu L, Pietropaolo M, Jackson RA, Chase HP, Eisenbarth GS (1996) Prediction of type I diabetes in first-degree relatives using a combination of insulin, GAD, and ICA512bdc/IA-2 autoantibodies. *Diabetes*. Jul;45(7):926-33.

Verma S, Buchanan MR, Anderson TJ, (2002). Endothelial Function Testing as a Biomarker of Vascular Disease. *Circulation*. . 108(17):2054-9

Vincent MA, Montagnani M & Quon MJ (2003).Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr. Diab. Rep* 3, 279-288

W-

Wagner EH, LaCroix AZ, Buchner DM, Larson EB. (1988) Effects of physical activity on health status in older adults. I: Observational studies. *Annu Rev Public Health*;13:451-68.

Walford G, Loscalzo J. (2003) Nitric oxide in vascular biology *J Thromb Haemost.* Oct;1(10):2112-8. Review

Walsh JH, Bilsborough W, Maiorana A, Best M, O'Driscoll GJ, Taylor RR, Green DJ (2003) Exercise training improves conduit vessel function in patients with coronary artery disease. *J Appl Physiol* (1985). 95(1):20-5.

Wang J, Flemal K, Morgan JP. (1993) Endothelin-1 enhances cross-bridge function of ferret myocardium: role of second messengers. *Am J Physiol*;265(6 Pt 2):H2168-74.

Wassmann, S., Wassmann, K. & Nickenig, G (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44(4):381-6

Watts GF, Burnett JR (2004) HDL revisited: new opportunities for managing dyslipoproteinaemia and cardiovascular disease. *Clin Biochem Rev*.25(1):7-18

Warburton DE, Nicol CW, Gatto SN, Bredin SS. (2007) Cardiovascular disease and osteoporosis: balancing risk management. *Vasc Health Risk Manag.* ;3(5):673-89. Review

Wheatcroft SB, Kearney MT, Shah AM, Grieve DJ, Williams IL, Miell JP, Crossey PA. (2003) Vascular endothelial function and blood pressure homeostasis in mice overexpressing IGF binding protein-1. *Diabetes.* 52(8):2075-82.

Wei, C.L., Khoo, H.E., Lee, K.H. and Hon, W.M. (2002). Differential expression and localization of nitric oxide synthases in cirrhotic livers of bile duct-ligated rats. *Nitric Oxide*. 7 : 91-102

Wenzel, R.R., Noll, G. and Luscher, T.F. (1994). Endothelin receptor antagonists inhibit endothelin in human skin microcirculation. *Hypertension*. 23 ; 581-586.

WHO. (1997) Obesity, preventing and managing the global epidemic: Report of the consultation of obesity. Geneva: World Health Organization: World Health Organization

WHO. (1998) Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of WHO consultation on obesity. Rep. WHO/NUT/NCD/98.1.WHO.Geneva. 276

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. (2004) Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. ;27(5):1047-53.

Woodman OL, Hart JL, Sobey CG (1997) Prevention of ischaemia-induced coronary vascular dysfunction. *Int J Cardiol.* . Suppl 2:S91-9.

Woodman RJ, Watts GF, Playford DA, Best JD, Chan DC (2005) Oxidized LDL and small LDL particle size are independently predictive of a selective defect in microcirculatory endothelial function in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* (5):612-7.

Woo SH, Lee WJ, Jeong WJ, Kyong YY, Choi SM. (2013) Blood alcohol concentration and self-reported alcohol ingestion in acute poisoned patients who visited an emergency department. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*. 10;21(1):24

Wu CC, Yu CT, Hsieh CP, Chen SJ, Chang IL(2008). Femoral head avascular necrosis after interlocking nail of a femoral shaft fracture in a male adult: a case report. *Arch Orthop Trauma Surg*. Apr;128(4):399-402

Y-

Yanagisawa A, Lefer AM, Vallance, P. (2001). Nitric oxide. Biologist (London). Pharmacological actions of synthetic atrial natriuretic factor on coronary vascular smooth muscle.. 48 (4) : pp 153-158

Z-

Zguira MS, Vincent S, Le Douairon Lahaye S, Malarde L, Tabka Z, Saïag B. (2013) Intense exercise training is not effective to restore the endothelial NO-dependent relaxation in STZ-diabetic rat aorta. Cardiovasc Diabetol. 11;12:32.

Zhou M, Ding L, Peng H, Wang B, Huang F, Xu WD, Li JH, Ye XR, Pan HF, Ye DQ. (2013) Association of the interleukin-10 gene polymorphism (-1082A/G) with systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. Lupus(2):128-35.

RESUME

L'activité physique (AP) régulière se révèle essentielle en terme de santé publique et est un déterminant important, impactant l'endothélium, pour assurer la prévention primaire et secondaire de nombreuses pathologies et facteurs de risques cardiovasculaires (HTA, IC, hypercholestérolémie, diabète, sédentarité, obésité, surpoids). Tant chez l'homme que chez l'animal, il est couramment accepté que l'AP modérée permet de restaurer la vasodilatation endothéliale dépendante médiée par le NO/EDRF (VED-NO) lorsque celle-ci est altérée chez des sujets diabétiques (1 et 2), obèses, en surpoids ou sédentaires. De nombreuses investigations, tant expérimentales que cliniques restent à explorer pour évaluer les paramètres (fréquence, intensité, durée) de différents types (endurance, résistance) d'exercices se révélant les plus bénéfiques pour améliorer une VED-NO détériorée dans de nombreuses pathologies et facteurs de risques cardiovasculaires. Dans un premier temps, par une approche expérimentale, nous avons eu pour objectif de déterminer les effets d'un entraînement intense sur VED-NO. L'étude a été réalisée avec des aortes isolées de rats diabétiques (type 1) sédentaires et entraînés. Dans un second temps, dans une étude clinique chez des adolescents (14-16 ans), nous avons cherché à savoir si un entraînement préalable modifiait la VED-NO après un exercice isolé aigu. Ce travail a été réalisé au niveau de la microcirculation cutanée de l'avant-bras, par débitmétrie « Laser Doppler ». Dans un troisième temps, toujours par une étude clinique par débitmétrie « Laser Doppler », nous avons enregistré les effets d'un entraînement musculaire de deux mois chez des femmes obèses tant au niveau de VED-NO qu'au niveau de biomarqueurs de l'inflammation (TNF alpha, leptine, Interleukine, visfatine). Nos principaux résultats montrent que : 1) L'inactivité physique et l'état diabétique de type 1 chez le rat provoquent, sur l'aorte isolée, une augmentation de la vasoconstriction à la Phényléphrine ainsi qu'une réduction importante de la VED-NO - inhibée par le L-NAME - induite par l'Ach comme par l'ADP β S via des récepteurs muscariniques M1/3 et purinergiques P2Y, 2) L'AP intense (sur tapis roulant, 60min/j, 25m/min, 5j/semaine, 8 semaines) chez le rat diabétique est inefficace à rétablir une VED-NO, 3) L'entraînement préalable de jeunes hommes (15+ ou - 1ans) permet, suite à un exercice isolé et aigu, d'améliorer la VED-NO induite par une iontophorèse d'ACh au niveau de la microcirculation cutanée de l'avant-bras (flux sanguin mesuré par Laser-Doppler), 4) L'AP (bicyclette ergométrique 1h, intensité à 50% de la FC max, 3j/semaine, 2 mois) chez des femmes obèses -IMC=38.5-, comparativement à des sujets témoins, restaure la VED-NO induite par une iontophorèse d'ACh au niveau de la microcirculation cutanée, 5) De plus, dans cette dernière étude, les capacités aérobies sont améliorées et apparaît une réduction importante des biomarqueurs de l'inflammation. En conclusion, nos travaux montrent qu'il y a encore beaucoup d'investigations à mener pour comprendre les mécanismes moléculaires conduisant à une réhabilitation de la fonction endothéliale préalablement altérée et qu'il faut continuer à préciser, pour chaque type de pathologie cardiovasculaire, les paramètres d'AP (intensité, durée, fréquence) les plus adaptés pour rétablir la VED-NO chez l'animal comme chez l'homme.

Mots clés: Activité physique, endothélium, vasodilatation, NO/EDRF, diabète, sédentarité, obésité

ABSTRACT

Regular physical activity appears to be essential in terms of public health. It is an important determinant, concerning the endothelium, for primary and secondary prevention of many diseases and cardiovascular risk factors (Hypertension, heart failure, hypercholesterolemia, diabetes, sedentariness, obesity, overweight). Both in man and in animals, it is well known that moderate physical activity can restore endothelium-dependent vasodilatation mediated by NO/EDRF (EDV-NO) when it was altered in diabetics (type 1 and 2), obese, overweight, sedentary. Many investigations, both experimental and clinical remain to be explored to evaluate parameters (frequency, intensity, duration) of different types of exercise (endurance, resistance) being the most beneficial for improving EDV-NO deteriorated in many diseases and cardiovascular risk factors. In a first time, by an experimental approach, we aimed to determine the effects of intense training on EDV-NO. The study was performed with isolated aortas of sedentary and trained diabetic rats (type 1). In a second time, in a clinical study in young men (14-16 years), we investigated whether prior training modifies EDV-NO after an acute isolated exercise. This work was performed in the cutaneous microcirculation of the forearm by « Laser Doppler » flowmetry. In a third time, in a clinical study by « Laser-Doppler » flowmetry, we recorded the effects of two months resistance training in obese women both in EDV-NO and on inflammatory biomarkers (TNF alpha, leptin, interleukin, visfatin). Our main results show that: 1) physical inactivity and type 1 diabetic state in rats cause on the isolated aorta, increased vasoconstriction induced by phenylephrine and a significant reduction in EDV-NO (inhibited by L-NAME) induced by Ach as ADP β S via M1/3 muscarinic and P2Y purinergic receptors. 2) Intense training (treadmill, 60min/day, 25m/min, 5d/week, 8 weeks) in diabetic rats is ineffective in restoring EDV-NO. 3) Prior training of young men, allows, after an isolated acute exercise, to improve EDV-NO induced by ACh iontophoresis in the cutaneous microcirculation of the forearm. 4) Physical activity (treadmill, walking 1 h, intensity 50% Heart Rate max, 3d/week, 2 months) in obese women (BMI=38.5) compared to control subjects, restores EDV-NO induced by ACh iontophoresis in the cutaneous microcirculation of the forearm. 5) In addition, the previous study, aerobic capacities are improved and appears a significant reduction in inflammatory biomarkers concentration. In conclusion, our researches show that there is still many studies to understand the molecular mechanisms leading to a restoration of impaired endothelial function. It is necessary to continue to specify, for each type of cardiovascular disease, the most appropriate parameters of physical activity adapted to restore EDV-NO in animal and man.

Keywords: Physical activity, endothelium, vasodilatation, NO/EDRF, diabetes, sedentariness, obesity